Untersuchungen zu Struktur und Funktion der Ribonuclease T_1

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Olaf Pongs

aus Hameln

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Untersuchungen zu Struktur und Funktion der Ribonuclease T_1

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Olaf Pongs

aus Hameln

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am 13.11.1968

Tag der mündlichen Prüfung am 16.11.1968

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. H. Witzel
Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Zilliken

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Verzeichnis der Abkürzungen	1
A.	Einleitung	3
B.	Spezifität der RNase T_1	9
C.	Einflüsse des Reaktionsmediums auf den Reaktionsablauf	14
1.	Theorie der Enzymkinetik für den "one substrate-one enzyme"-Fall	14
2.	Abhängigkeit der kinetischen Parameter vom Substrat	15
3.	Abhängigkeit der kinetischen Parameter von der Wasserstoffionenkonzentration	19
4.	Abhängigkeit der kinetischen Parameter von der Ionenstärke	25
5.	Abhängigkeit der kinetischen Parameter vom Dielektrikum	29
6.	Abhängigkeit der kinetischen Parameter von der Temperatur	34
D.	Strukturuntersuchungen an der RNase T_1	39
1.	Ergebnisse der Kernresonanz-Spektroskopie	41
2.	Ergebnisse der Fluoreszenz-Spektroskopie	49
3.	Ergebnisse der Differenz-Spektroskopie	57
E.	Einfluß von Modifizierern auf die RNase T_1-Reaktion	62
1.	Theorie der Hemmung für den "one enzyme-one substrate"-Fall	62
2.	Auftreten von Sigmoidität im "one enzyme-one substrate"-Fall	64
3.	Modifizierung der RNase T_1-Reaktion bei pH 7,0	67
4.	pH-Abhängigkeit der Hemmung der GpC-Spaltung durch RNase T_1	74
F.	Zusammenfassung	81
G.	Experimenteller Teil	84
1.	Darstellung der Substrate	84
2.	Darstellung des Enzyms	88
3.	Kinetische Messungen	89
4.	Spektroskopische Messungen	91
H.	Literaturverzeichnis	93

Verzeichnis der Abkürzungen

In den kinetischen Ableitungen werden folgende Ableitungen verwendet:

E = Enzym
S = Substrat
P = Produkt
I = Inhibitor
ES = Enzym-Substrat-Komplex
EI = Enzym-Inhibitor-Komplex
EIS = Komplex aus Enzym, Substrat und Inhibitor

e = totale Enzymkonzentration
s = Substratkonzentration
p = Produktkonzentration
i = Inhibitorkonzentration
x,y = Konzentration an ES bzw. EI
t = Zeit
v = Reaktionsgeschwindigkeit (Anfangsgeschwindigkeit)
$\hat{v}$ = Anfangsgeschwindigkeit bezogen auf ein Mol Enzym
V° = Geschwindigkeit für s, bei der Maximalgeschwindigkeit erreicht wird
v_{max} = Maximalgeschwindigkeit
Km = Briggs-Haldane-Konstante
K_s = Michaelis-Menten-Konstante
K_i = Dissoziationskonstante von EI, EIS
k_{cat} = gemessene Geschwindigkeitskonstante aus V°/e = k_{+2}
k_{+1} usw. = Geschwindigkeitskonstanten definierter Schritte

Q_F = relative Fluoreszenz-Intensität

Die Bezeichnung der Substrate erfolgt nach den IUPAC-IUB-Vorschlägen in European J. Biochem. 1 (1967):

A, G, C, U sind die Nucleoside Adenosin, Guanosin, Cytidin und Uridin.
Ap, Gp, Cp, Up sind die entsprechenden 2'- oder 3'-Mononucleotide.

GpC usw. sind Dinucleosidphosphate mit 3'-5'-Verknüpfungen.

G-2':3'-P usw. sind Abkürzungen für zyklische 2'-3'-Nuceotide.

N-1-me-G usw. sind am entsprechenden Atom methylierte Substrate.

RNA = Ribonucleinsäure

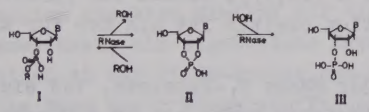
RNase A = Pankreas-Ribonuclease A (E.C. 2.7.7.16)
RNase T_1 = Takadiastase-Ribonuclease T_1 (E.C. 2.7.7.26)
RNase T_2 = Takadiastase-Ribonuclease T_2 (E.C. 2.7.7.21)

TMS = Tetramethylsilan

A. Einleitung

Die RNase T_1 wurde von Egami et al. (1,2,3) vor nahezu 10 Jahren aus Takadiastase, einem Extrakt aus Aspergillus oryzae isoliert. Die Basenspezifität der RNase T_1 unterscheidet sich charakteristisch von der der gut untersuchten RNase A, da sie nur die 3'-5'-Phosphodiesterbindung spaltet, wenn diese in 3'-Stellung ein 6-Hydroxy-Purin-Nucleotid enthält. Diese Eigenschaft machte die Verwendung der RNase T_1 als Hilfsmittel zur Ermittlung der Primärstruktur von Transfer-Ribonucleinsäuren sehr geeignet. In Analogie zu der Verwendung verschiedener Proteasen bei der Aufklärung der Primärstruktur von Proteinen wurde es möglich, in Kombination mit der Pyrimidin-spezifischen RNase A sich überschneidende Sequenzen zu erhalten, die die Aufklärung der Nucleotidsequenzen wesentlich erleichterten.

Die Spaltung der 3'-5'-Phosphodiesterbindung (I) in RNA durch RNase A, RNase T_1 und auch durch die RNase T_2 - die alle 3'-5'-Internucleotidbindungen spaltet- folgt dem gleichen Reaktionsschema: Eine Transphosphorylierung zu einem zyklischen Dieester (II) ist der erste Schritt, dem in einem zweiten Schritt eine Hydrolyse zu dem entsprechenden 3'-Monoester (III) folgt. Auf Grund dieser Analogien hat man im besonderen bei einem Vergleich der RNase A mit der RNase T_1 versucht, Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion von Enzymen zu finden (4,5,6,7).



I II III

B = A,G,U,C bei RNase T_2 R = U,C,G,A
B = U und C bei RNase A
B = G bei RNase T_1

Bei der Transphosphorylierung greift die 2'-OH-Gruppe den Phosphor nucleophil an und die Esterbindung zur 5'-OH-

Gruppe des folgenden Nucleosides wird gespalten. Bei der Hydrolyse des resultierenden 2',3'-zyklischen Diesters (II) im zweiten Schritt greift ein Wasser-Molekül nucleophil an. Die im ersten Schritt gebildete 2'-Esterbindung wird nun wieder gespalten und als Produkt entsteht ausschließlich ein 3'-Monoester (III). Wenn als Nucleophil ein Nucleosid mit einer freien 5'-OH-Gruppe im zweiten Schritt an Stelle des Wasser-Moleküls angreift, wird wieder ein 3'-5'-Diester gebildet (8,9,10). Es ist offensichtlich, daß der zweite Schritt als Umkehr des ersten abläuft und HOH und HOR einander ersetzen können.

Mehrere Arbeiten sind unternommen worden, um im Verhalten der RNase A und der RNase T_1 in Bezug auf Substrate, Inhibitoren und chemische Agentien weitergehende Analogien zu finden, da man von der Annahme ausging, daß trotz einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz und Tertiärstruktur von ihnen ein gemeinsames katalytisches Prinzip zur Durchführung der gleichen Reaktion verfolgt wird. Das heißt, die makroskopische Uebereinstimmung im Reaktionsschema führte dazu, auch mikroskopische Analogien, i.e. analoge Uebergangs- und Zwischenzustände und Einzelschritte, zu suchen.

So fanden Yamagata et al.(11) Analogien bei der Photooxydation der beiden Proteine in Gegenwart von Methylenblau. RNase A und RNase T_1 werden beide inaktiviert, wobei in beiden Fällen die Inaktivierung im Zusammenhang mit der Zerstörung eines Histidins steht (12). Die Inaktivierung durch Jodacetat wurde von Saigusa et al.(13) berichtet. Die pH-Abhängigkeit (14,15) zeigt ein Maximum bei pH 5,5 und ähnelt dem der RNase A (16,17), obwohl der pH-Bereich der Inaktivierungs-Reaktion breiter ist als der für die RNase A gefundene (17).

3'-Gp, das Produkt der RNase T_1-Katalyse, ist ein starker Inhibitor. Der 2'-Monoester hemmt bei pH 5,0 noch etwas stärker (18). Dies wurde bei der RNase A auch gefunden. Die Bindung der Inhibitoren ruft Differenzspektren bei beiden Enzymen hervor (7,19,20), wobei $\Delta\varepsilon$ zur Bindungsstärke in Beziehung gesetzt wird (21). Bei RNase T_1 und 2'-Gp liegt das entsprechende Optimum bei pH 5,0. Im Vergleich dazu liegt das von RNase A und 2'-Cp bei pH 5,5. Beide En-

zyme können durch dies Inhibitoren gegen eine Carboxymethylierung mit Brom- bzw. Jodacetat geschützt werden (5, 22).

Während die Spezifität beider Enzyme bei der Spaltung von Oligonucleotiden begrenzt ist, gilt dies nicht mehr für Polynucleotide. Polynucleotide wie polyA werden von beiden Enzymen depolymerisiert, wobei Oligonucleotide mit endständigen 2',3'-zyklischen Phosphodiestergruppierungen entstehen (23,24).

Einige Ergebnisse lassen jedoch erkennen, daß die aufgezeigten Analogien nicht allzu weit getrieben werden können. Durch umfassende kinetische Untersuchungen der RNase A-Katalyse (25) konnte gezeigt werden, daß die Spezifität der RNase A in einem Charakteristikum ihrer Katalyse selbst zu suchen ist. Der Keto-Sauerstoff der Base in α-Stellung zur ß-Glycosid-Bindung führt eine Basen-Katalyse an der 2'-OH-Gruppe zum Aufbau eines Enzym-stabilisierten Zwischenzustandes mit fünfbindigem Phosphor durch. Dann wird von der gleichen Base in Form der konjugaten Säure eine Protonen-Katalyse durchgeführt, die zur Spaltung der 2'- bzw. der 5'-Esterbindung führt. Zur Stabilisierung des Zwischenzustandes trägt das Enzym durch zwei protonierende Gruppen bei. Die Base selbst wird vom Enzym lediglich durch hydrophobe Wechselwirkungen fixiert. Beide Reaktionsschritte zeigen dadurch die gleiche pH-Abhängigkeit.

Bei der RNase T_1-Katalyse hingegen sollte die Spezifität in enger Beziehung zum protonierten N-1-Stickstoff und/oder zum C-6-Sauerstoff stehen (5,6). Diese Seite an der Base kann keinen direkten Einfluß auf die Seite haben, wo der Bindungswechsel, die eigentliche Katalyse also, stattfindet, nämlich an der 2'-OH-Gruppe und am Phosphor. Demnach wird die Base durch Wasserstoffbrücken spezifisch gebunden (5). Dies erfordert auf der anderen Seite eine separate katalytische Seite im aktiven Zentrum des Enzyms, die ebenfalls zur Bindung beitragen kann. Ein Vorschlag für die Bindung von Inhibitoren wie 2'-Gp ist von Sato und Egami gemacht worden (7), die neben der spezifischen Bindungsseite an der Base zwei Imidazole postulieren, die zur

monoprotonierten Form des Phosphats binden.
Bemerkenswerte Unterschiede lassen sich auch feststellen, wenn man die Kinetik der Dinuleosidphosphate mit der der 2',3'-zyklischen Diester bei beiden Enzymen vergleicht. Die schnellere Spaltung der Dinucleosidphosphate durch die RNase A hängt von der Vorordnung der reagierenden Gruppen im Substrat ab (26). Eine Parallelität zwischen Geschwindigkeit und "base stacking" spiegelt diesen Tatbestand wieder. Der Geschwindigkeitsunterschied zwischen UpA, dem schnellsten Substrat in der 3'-Up-Reihe, und UpU, dem langsamsten, ist mehr als hundertfach und geht ausschließlich in k_{+2}, nicht in K_m ein. 2',3'-zyklische Uridylsäure wird nur 5mal langsamer gespalten als UpU.
Der Geschwindigkeitsunterschied zwischen GpC, dem schnellsten Substrat der 3'-G-Reihe, und GpU, dem langsamsten, ist in der RNase T_1-Katalyse lediglich ein Faktor 4 (6). Jedoch zwischen dem langsamsten Dinucleosidphosphat der 3'-G-Reihe und 2',3'-zyklische Guanylsäure besteht ein Geschwindigkeitsunterschied um einen Faktor 100. Die zusätzliche spezifische Bindung zeigt weiterhin an, daß die Bedeutung der kinetischen Konstanten K_m und k_{cat} bei beiden Enzymen verschieden sein sollte. Ebenso sollte die pH-Abhängigkeit der Reaktion für beide Enzyme verschieden sein.
Das pH-Profil der kinetischen Parameter für die Hydrolyse von 2':3'-G-P unterscheidet sich tatsächlich von dem entsprechenden bei der RNase A (27).Die nach herkömmlichen Verfahren abgeleiteten pK-Werte von 4,2, 6 und 7,4 für das freie Enzym und von 5,0, 6,0 und 7,4 für den Enzym-Substrat-Komplex weichen von den Werten für die RNase A ab, wenn auch die Berechtigung dieser Verfahren in Frage steht.Auch konnte gezeigt werden, daß die Carboxymethylierung, obwohl sie eine gleiche pH-Abhängigkeit zeigt und durch analoge Verbindungen blockiert werden kann, zu einer Reaktion mit Glutaminsäure 58 führt (14) und nicht mit einem Histidin wie bei der RNase A. Dies deutet darauf hin, daß die am Aufbau des aktiven Zentrums der RNase T_1 beteiligten Gruppen von denen der RNase A verschieden sein sollten und ein anderes katalytisches Prinzip verfolgt werden sollte.

Aus kinetischen Messungen alleine, die ausschließlich die pH-Abhängigkeit eines Teils der Katalyse umfassen, läßt sich jedoch kein umfassendes Verständnis einer enzymatischen Reaktion erlangen. Die von Irie (27) durchgeführten Untersuchungen beschränken sich auf den 2. Schritt der Reaktion, die Hydrolyse, und auf ein einziges Substrat. Die Abhängigkeit der kinetischen Parameter von der Variation des Substrates und vom Reaktionsmedium, deren Kenntnis eingehende Rückschlüsse auf den Mechanismus zuläßt, war ebensowenig bekannt. So konnte nach den bisher vorliegenden Daten nicht entschieden werden, ob die spezifische Bindung des 6-Hydroxy-Purins an der Carbamid-Gruppe geschwindigkeitsbestimmend ist oder ob die Wechselwirkung an der katalytischen Seite der langsamste Schritt der Reaktion ist. Ferner ist ungeklärt, ob die nach der Umesterung stattfindende Hydrolyse sich gleich anschließt, d.h. ob das Substrat, wenn es einmal an der Haftstelle im aktiven Zentrum der RNase T_1 gebunden ist, gleich weiter zum 3'-Monoester hydrolysiert wird. Weiterhin gilt es zu zeigen, ob die beiden Seiten im aktiven Zentrum der RNase T_1 voneinander unabhängig sind oder ob zwischen ihnen eine Kooperativität besteht, d.h. eine Wechselwirkung an der einen Seite induziert eine Konformationsänderung an der andern Seite. Ebenso konnten mechanistische Details über die Rolle einzelner Aminosäuren des aktiven Zentrums während des Katalyseablaufs noch nicht erkannt werden und definitive Aussagen über das strukturellr Verhalten des Proteins bei der Reaktion waren nicht möglich.

Kinetische Untersuchungen, die zur Aufklärung des Mechanismus einer "one substrate - one enzyme"- Reaktion herangezogen werden, legen das allgemeine Reaktionsschema

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES_1 \quad \cdots\cdots \quad ES_{n-1} \underset{k_{-n}}{\overset{k_{+n}}{\rightleftharpoons}} ES_n \xrightarrow{k_{+n+1}} E + P$$

zugrunde, um die kinetischen Daten zu erklären. Phänomene der Allosterie oder der Kooperativität werden hierbei ausgeschlossen. Die theoretischen Vorstellungen, aus denen ein solches System entwickelt worden ist, sind jedoch recht begrenzt (sh.28), so daß nicht jedes "one enzyme - one substrate"-System diesem Schema folgen sollte. Die RNase T_1 hat im aktiven Zentrum eine spezifische Bindungsseite und eine

katalytische Seite. Dies sollte nicht nur seine Wirkungsweise komplexer machen, sondern stellt auch in Frage, ob die Anwendung von Berechnungen, die auf dem obigen allgemeinen Reaktionsschema fußen, berechtigt ist, d.h. ob die kinetischen Daten im Sinne von Michaelis-Menten oder Briggs-Haldane behandelt werden können.

Während der Mechanismus der RNase A-Katalyse auf Grund einer Vielzahl von Untersuchungen unter Anwendung der Röntgenstruktur-Analyse, von Kernresonanz-, Relaxations-, kalorimetrischen und kinetischen Messungen weitgehend verstanden werden konnte, ist dies für die RNase T_1-Katalyse nicht der Fall, zumal hier noch entsprechende Untersuchungen fehlen.

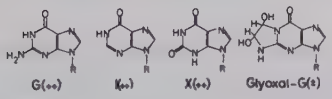
Mit Hilfe einer umfassenden kinetischen Analyse, der Fluoreszenz-, der Kernresonanz- und der Differenz-Spektroskopie wird in der vorliegenden Arbeit versucht, Aufschlüsse über den Ablauf der Reaktion des Enzyms mit dem Substrat, d.h. über Struktur und Funktion der RNase T_1 zu erhalten und zu einem größeren Verständnis der enzymatischen Katalyse beizutragen.

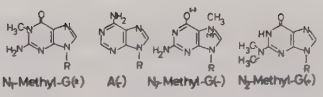
B. Spezifität der RNase T_1

Bei den Untersuchungen zum Mechanismus der RNase A konnte festgestellt werden, daß die Spezifität dieses Enzyms nicht an das Vorhandensein eines Pyrimidinringes gebunden ist, sondern lediglich durch ein Strukturmerkmal der Pyrimidinnucleotide, den Carbonylsauerstoff am C-2-Atom, bedingt wird (25). So werden von der RNase A auch entsprechend substituierte Purine wie 8-OH-G-2':3'-P oder N-9-Harnsäureribotid gespalten. Konformationsstudien von Ts'o (29,30) und von Fox (31) - unter Anwendung der UV-, ORD- und NMR-Spektroskopie - haben gezeigt, daß eine Wechselwirkung zwischen der 2'-OH-Gruppe der Ribose mit dem für den Ablauf der RNase A-Katalyse essentiellen Carbonylsauerstoff der Pyrimidine besteht und ebenfalls eine solche, wenn auch wesentlich schwächere, mit dem N-3-Atom der Purine.
Durch geeignete Substratvariationen sollte sich feststellen lassen, ob die Basenspezifität der RNase T_1 durch eine Bindungsspezifität, wie sie z.B. bei der Guanosindeaminase gefunden worden ist (32), bedingt ist oder ob der N-3-Stickstoff am Purin-Ring in Analogie zur RNase A ein notwendiges Strukturmerkmal ist. Ebenso sollte die Existenz eines kritischen Abstandes zwischen der spezifischen Bindungsseite und der katalytischen Seite festgestellt werden können.

Untersuchungen zur Basenspezifität wurden bereits von Whitfeld und Witzel (6) mit verschiedenen Dinucleosidphosphaten als Substrate, von Cantoni (33) und von Staehelin (34) mit t-RNA und von Egami (5) mit RNA als Substrat durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1





++	schnelle Spaltung	+	Spaltung
±	langsame Spaltung	-	keine Spaltung

Die Spaltung der methylierten Verbindungen wurde an den Polynucleotiden RNA und t-RNA als Substrat beobachtet. Da diese Spaltungen nicht ohne weiteres auf die enzymatische Spaltung der monomeren Diester übertragen werden können, wurden von mir GpC und G-2':3'-P am N-1- und N-7-Stickstoff methyliert.

G-2':3'-P wurde mit Diazomethan bei Raumtemperatur unter pH-Kontrolle bei pH7,0 methyliert. GpC wurde bei 4°C nach Michelson und Pochon (35) methyliert. Die Reinigung erfolgte papierchromatographisch und die Analyse durch Hydrolyse zu den entsprechenden methylierten Guaninen, deren spektrale Daten bekannt sind (36).

Von N-1-Methyl-GpC und N-7-Methyl-GpC wurden 10^{-5} molare Lösungen mit RNase T_1 in 10^{-9} molarer Konzentration versetzt. Die Lösungen von N-1-Methyl-G-2':3'-P und N-7-Methyl-G-2':3'-P waren 10^{-3} molar und wurden mit RNase T_1 in 10^{-7} molarer Konzentration versetzt. Diese Konzentrationen sind gleich denen, die bei analogen Umsetzungen während der kinetischen Messungen eingesetzt wurden. Beide Lösungen wurden bei Raumtemperatur in DMG/Tris-Puffer pH 7,0 12 Stunden stehen gelassen. Die Analyse der Spaltprodukte erfolgte papierchromatographisch und UV-spektrophotometrisch. Keine der vier methylierten Verbindungen wird von der RNase T_1 gespalten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Spaltung nur dann abläuft, wenn die Lactam-Gruppierung des Guanins intakt ist. Sowie der N-1-Stickstoff deprotoniert wird, findet keine Spaltung

mehr statt. Die Base wird von der RNase T_1 spezifisch über die Carbamid-Struktur an N-1-C-6 gebunden.
Die natürlichen Purinnucleotide liegen in der anti-Konformation vor (37), wobei die Base mit der Ribose ß-glykosidisch verknüpft ist. Entsprechende α-Nucleotide werden nicht gespalten (38). Um zu klären, ob darüberhinaus die Stereoselektivität der RNase T_1 eine Unterscheidung zwischen der syn- und anti-Konformation beinhaltet, wurden 8-OH-G-2':3'-P und 8-Br-G-2':3'-P als Modellsubstanzen eingesetzt, die vorwiegend in der syn-Konformation vorliegen. Abbildung 2 zeigt diese Verhältnisse schematisch.

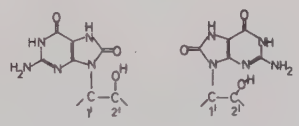


Abb.2: syn- und anti-Konformation von 8-OH-G

8-OH-G-2':3'-P und 8-Br-G-2':3'-P werden im Vergleich zu G-2':3'-P wesentlich langsamer gespalten. Dies zeigt, daß die räumliche Stellung der spezifischen Bindungsseite zur katlytischen Seite für den Ablauf der Katalyse wichtig ist.
UpC hat eine zu GpC analoge Carbamid-Struktur im Uracil-Ring (Abb.3), jedoch ist diese Gruppierung in der Lage zur katalytischen Seite gegenüber GpC um 2 Å verschoben.

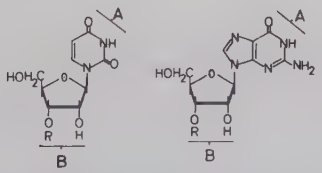


Abb.3: Abstand zwischen der spezifischen Bindungsseite (A) und der katalytischen Seite (B) bei UpC und GpC

UpC wird von der RNase T_1 nicht gespalten. Dies bedeutet, daß der Abstand zwischen Bindungs- und katalytischer Seite im aktiven Zentrum so kritisch ist, daß eine Abstandsänderung von 2 Å den Ablauf der Reaktion unmöglich macht.

Folgerungen

Die sterischen Anforderungen an das Substrat sind sehr hoch, da nur ß-Nucleotide der anti-Konformation gespalten werden. Der genau festgelegte Abstand zwischen der spezifischen Bindungsseite und der katalytischen Seite kann nur erreicht werden, wenn die funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum stark fixiert sind. Die Bindung erfolgt spezifisch an der Carbamid-Gruppe des Pyrimidin-Ringes im Guanosin. Aus energetischen Gründen sollte dies durch eine synchrone Zwei-Punkt-Fixierung geschehen, d.h. die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem N-1-Stickstoff des Guanins und einer Base sollte konform gehen mit einer entsprechenden Wasserstoffbrücke zwischen dem C-6-Carbonylsauerstoff und einem Protonendonor. Aus dem parallelen Ablauf dieses elektrophilen bzw, nucleophilen Schrittes ist zu erwarten, daß im aktiven Zentrum des Enzyms die Base und der Protonendonor als BH···B-System miteinander gekoppelt sind und damit den definierten Abstand zur katalytischen Seite einnehmen. Es kann sich so ein energetisch günstiges mesomeres System ausbilden, das jederzeit reversibel ist. Aus diesen Gründen sollte Abbildung 4 den Verhältnissen an der spezifischen Bindungsseite am nächsten kommen.

Abb.4: Die spezifische Bindungsseite der RNase T_1

Aus der wesentlich langsameren Spaltung von 8-OH-G-2':3'-P kann weiterhin gefolgert werden, daß vom Enzym aus keine doppelte Protonierung an der Phosphat-Gruppe wie bei der RNase A stattfindet. Es müßten sonst alle Verbindungen gespalten werden, die zu einer intramolekularen Katalyse an der 2'-OH-Gruppe befähigt sind. Eine einfache Protonierung macht eine zusätzliche Basen-Katalyse des Enzyms an der 2'-OH-Gruppe bzw. an dem im zweiten Schritt angreifenden Wassermolekül notwendig. Aufschluß hierüber sollte die Analyse der Kinetik des Reaktionsablaufs ergeben.

C. Einflüsse des Reaktionsmediums auf den Reaktionsablauf

1. Theorie der Enzym-Kinetik für den "one substrate - one enzyme"-Fall

Nach den Vorstellungen von Michaelis und Menten stehen E, S und ES in einem sich sehr schnell einstellenden Gleichgewicht:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \qquad \text{Gl. 1}$$

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion soll im Zerfall des Komplexes ES bestehen:

$$ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P \qquad \text{Gl. 2}$$

Voraussetzung ist hier, daß das Gleichgewicht in Gl.1 stets erhalten bleibt. Dies kann aber sehr häufig in Anbetracht der hohen Geschwindigkeiten vieler Enzymreaktionen nicht mehr erfüllt sein.
Briggs und Haldane nehmen deshalb an, daß die Geschwindigkeiten der Bildung und des Zerfalls von ES zu jedem Zeitpunkt gleich sind, d.h. $d(ES)/dt = 0$ (stationärer Zustand), eine Annahme, die nur für das Anfangsstadium der Reaktion gilt. Es werden deshalb auch nur Anfangsgeschwindigkeiten gemessen und ausgewertet. Danach erhält man für die Anfangsgeschwindigkeit v_o:

$$v_o = \frac{k_{+2} \cdot e}{1 + \frac{K_m}{s}} \quad , \qquad \text{Gl. 3}$$

wobei K_m als

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad , \qquad \text{Gl. 4}$$

definiert ist. Gl.3 behält auch seine Gültigkeit, wenn man Gl.1 und Gl.2 zu Gl.5 erweitert:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES_1 \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftharpoons}} ES_2 \rightleftharpoons \ldots\ldots \underset{k_{-n}}{\overset{k_{+n}}{\rightleftharpoons}} ES_n \xrightarrow{k_{+n}} E + P, \qquad \text{Gl.5}$$

d.h. eine lineare Erweiterung von Gl.1 und Gl.2 ändert nichts an der prinzipiellen Form von Gl.3.

Aus Gl.4 läßt sich Gl.6 ableiten:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{k_{+2}\, e} \cdot \frac{1}{s_o} + \frac{1}{k_{+2} \cdot e} \qquad \text{Gl. 6}$$

Nach dem Verfahren von Lineweaver-Burk (39) wird für eine Serie von verschiedenen s_o das jeweilige v_o ermittelt und in einem Diagramm $1/s_o$ gegen $1/v_o$ aufgetragen. Der Abschnitt auf der $1/v_o$-Achse liefert dann den Wert $1/v_{max}$, der Abschnitt auf der $1/s_o$-Achse den Wert für $-1/K_m$. Oft muß aus meßtechnischen Gründen innerhalb einer Meßreihe die Enzymkonzentration verändert werden. Dann ist es zweckmäßiger, nicht nach Lineweaver-Burk aufzutragen, sondern e/v_o gegen $1/s_o$, denn aus Gl.6 läßt sich ableiten:

$$\frac{e}{v_o} = \frac{K_m}{k_{+2}} \cdot \frac{1}{s_o} + \frac{1}{k_{+2}} \qquad \text{Gl. 7}$$

Die Michaelis-Menten Theorie und die Briggs-Haldane Theorie unterscheiden sich nur in der Definition der Konstanten. Alle nach Michaelis-Menten abgeleiteten Gleichungen lassen sich durch Austausch von K_s gegen K_m in Gleichungen der Briggs-Haldane Kinetik verwandeln. Die Auswertung der kinetischen Messungen liefert lediglich eine Konstante K°, die je nach Reaktionstyp als K_m oder K_s interpretiert werden muß. Aus dem Reaktionstyp muß entschieden werden, ob es sich um eine Gleichgewichtskonstante K_s handelt oder um K_m, also nach Gl.4 um eine Konstante mit komplexen kinetischen Elementen. Dieser Unterschied erlangt bei thermodynamischen Betrachtungen Bedeutung.

2. Abhängigkeit der kinetischen Parameter vom Substrat

Die Spaltung der 3'-5'-Dinucleosidphosphate GpC, GpA, GpG, GpU und IpC durch die RNase T_1 wurde spektrophotometrisch in DMG-Puffer bei 25°C verfolgt. Im Bereich des Absorptionsmaximums dieser Substrate nimmt die Extinktion während der

Reaktion um 6-11% zu, hervorgerufen durch die Abnahme der Hyperchromie. Da kein spektraler Unterschied zwischen G-2':3'-P und 3'-Gp besteht, stört die sich an die Umesterung anschließende Hydrolyse die Messungen nicht. Die logarithmische Auftragung der Umsetzung gegen die Zeit ("first order"plot") ergibt gerade Linien. Dies zeigt, daß das Produkt der Umesterung, G-2':3'-P, keine Hemmung hervorruft. Da die Geschwindigkeit der folgenden Hydrolyse -des G-2':3'-P zu 3'-Gp- um einen Faktor 10^2 langsamer verläuft (6), stört das dabei gebildete Endprodukt 3'-Gp, das ein starker Inhibitor ist, die Messung der Anfangsgeschwindigkeit des ersten Schrittes nicht.

Tabelle 2 enthält die gemessenen K_m- und k_{cat}-Werte für die Spaltung verschiedener Substrate. XpC zeigt keine meßbare Exstinktionsänderung bei pH-Werten, bei denen die Xanthin-Base negativ geladen ist. Unterhalb von pH 6, wenn dies nicht mehr der Fall ist, kann die Reaktion spektrophotometrisch verfolgt werden. Die Ergebnisse bei pH 5,6 sind ebenfalls in Tabelle 2 wiedergegeben und sind mit den entsprechenden Werten von GpC vergleichbar.

Tabelle 2

Substr.	pH	K_m(mM)	k_{cat}(sec^{-1})	k_{cat}/K_m ($sec^{-1}M^{-1}$)	Rel. Geschw.	h%
GpC	7,0	0,110	163,0	$14,8 \cdot 10^5$	800	8,7
GpA	7,0	0,086	90,0	$10,4 \cdot 10^5$	550	7,6
GpG	7,0	0,078	70,0	$8,9 \cdot 10^5$	450	6,9
GpU	7,0	0,057	20,4	$3,6 \cdot 10^5$	250	2,4
IpC	7,0	0,055	4,3	$0,8 \cdot 10^5$	150	
XpC	5,6	0,051	0,5	$0,1 \cdot 10^5$	10	
GpC	5,6	0,172	249,0	$14,5 \cdot 10^5$		
G-2!34P	7,0	5,0	23,0	$4,6 \cdot 10^3$	2	

In der Reihe der 3'-Guanylsäure-Diester GpC bis GpU bewirkt eine Änderung des 5'-Nucleosids eine Änderung von K_m und k_{cat}. Dabei kann K_m als lineare Funktion von k_{cat} ausge-

drückt werden (Abb.5).

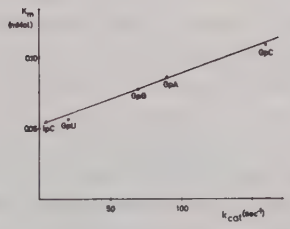


Abb.5: k_{cat} als f(K_m) für verschiedene Dinucleosidphosphate

K_m kann deshalb nicht eine Gleichgewichtskonstante im Sinne von K_s nach Gl.1 sein. Der Anstieg der Geraden in Abb.5 ist $\neq 1$, d.h. K_m kann ebenfalls nicht -basierend auf Gl.1 und Gl.2- als k_{+2}/k_{+1} ausgedrückt werden. Die $\Delta(\Delta k_{cat})$- und $\Delta(\Delta K_m)$-Werte in Abb.5 sind der entsprechenden relativen Umsetzungsgeschwindigkeit proportional. Die Relativ-Geschwindigkeiten können so exakt durch den Quotienten k_{cat}/K_m wiedergegeben werden. Tabelle 2 enthält deshalb zusätzlich die Werte dieses Parameters und die von Whitfeld und Witzel gemessenen Relativ-Geschwindigkeiten. Außerdem sind die von Tinoco (40) bestimmten Hyperchromie-Werte in Prozent wiedergegeben. 3'-Guanylsäurebenzylester, der analog zur Methode von Follmann (41) dargestellt wurde und der keine Hyperchromie zeigt, wird 10mal langsamer gespalten als GpU. Eine Abhängigkeit zwischen der Abnahme der Umsetzungsgeschwindigkeit der 3'-Guanylsäure-Diester und der Abnahme der Hyperchromie-Werte ist offensichtlich.
Im zweiten Schritt der Reaktion ist Wasser anstelle der 2'-OH-Gruppe das angreifende Nucleophil. Im "first order"-plot" erkennt man eine Verlangsamung der Geschwindigkeit mit fortschreitender Reaktion. Die Linien biegen nach oben ab. Dies

zeigt eine starke Produkt-Hemmung durch die gebildete 3'-Gp an. K_m nimmt im Vergleich zu GpC um einen Faktor 55 zu und k_{cat} um einen Faktor 7 ab. In der Relativ-Geschwindigkeit drückt sich dies in einer Abnahme um einen Faktor 400 aus. Bei der Hydrolyse von G-2':3'-P werden Protonen freigesetzt. Die Freisetzung wurd in 0,2 M NaCl-Lösung mit der pH-stat-Methode gemessen. Da die Spaltung der Diester nur spektrophotometrisch zu messen ist, sollen aus den Absolutwerten der kinetischen Parameter keine direkten Schlüsse gezogen werden.
Wenn für beide Schritte die spezifische Bindung am Guanin gleich ist, könnte erwartet werden, daß der zweite Schritt ohne vollständigen Zerfall des Enzym-Produkt-Komplexes sich an den ersten Schritt anschließt. Dies kann ausgeschlossen werden. Enzymkonzentrationen, die für die Umesterung ausreichen, spalten GpC nur in G-2':3'-P und Cytidin. Bei der papierchromatographischen Analyse kann keine 3'-Guanylsäure, das Produkt des zweiten Schrittes der Reaktion, festgestellt werden. Die Hydrolyse findet erst bei höheren Enzymkonzentrationen statt, wenn die 3'-5'-Diester bereits vollständig gespalten worden sind. In der Geschwindigkeit der Protonenfreisetzung besteht kein Unterschied, wenn man GpC oder G-2':3'-P als Substrat unter identischen Bedingungen einsetzt. Dies zeigt, daß Umesterung und Hydrolyse zwei voneinander unabhängige Schritte des Gesamtablaufs der Reaktion sind. Die Kinetik beider Schritte kann deshalb getrennt untersucht und behandelt werden.

Folgerungen

Wenn die Katalyse des Bindungswechsels nur nach einer zusätzlichen spezifischen Bindung des Substrats durchgeführt werden kann, kann sie kein diffusionskontrollierter Prozeß sein. Eine größere Vorordnung im Substrat sollte dann auch eine größere Senkung der Aktivierungsenergie, d.h. eine schnellere Reaktion bewirken. Dem entspricht die gefundene Parallelität zwischen Hyperchromie-Wert und Umsetzungsgeschwindigkeit in der G-Reihe. Der Hyperchromie-Wert kann als

Maß für die Stärke des "base-stacking" angesehen werden. Wie an Kalotten-Modellen gesehen werden kann, hat ein stärkeres "base-stacking" eine häufigere für den Bindungswechsel günstige Stellung der 2'-OH-Gruppe zum Phosphat zur Folge. Die Geschwindigkeitsunterschiede zwischen den Guanin-, Hypoxanthin- und Xanthin-3'-5'-Diestern gehen offensichtlich parallel zum pK-Wert der spezifisch gebundenen Carbamid-Gruppierung der Base. Die in dieser Richtung abnehmende Polarisierbarkeit der Basen, die sich in der Abnahme der pK-Werte ausdrückt, kann die Ursache der gefundenen Unterschiede sein. Eine Bindung der Base, wie in Abb.4 angenommen wird, sollte empfindlich von der Polarisierbarkeit abhängen.
Der große Geschwindigkeitsunterschied zwischen dem ersten und zweiten Schritt bei gleicher Base ist jedoch nicht allein durch die Vorordnung im Substrat wie bei der RNase A zu erklären. Wenn von der katalytischen Seite zur Bindung beigetragen wird, so muß der Beitrag in beiden Schritten unterschiedlich sein. Im ersten Schritt wird die 2'-OH-Gruppe aktiviert, die ein Teil des Substrats ist, im zweiten Schritt jedoch ein vom Substrat unabhängiges Wassermolekül.

3. Abhängigkeit der kinetischen Parameter von der Wasserstoffionenkonzentration

Abbildung 6 zeigt die pH-Profile von K_m und k_{cat} der Spaltung von GpC im pH-Bereich von 3,4 bis 7,8 bei 25°C. Die entsprechenden pH-Profile für die Spaltung von GpA und GpU sind analog.

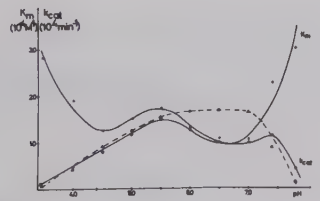


Abb.6: pH-Abhängigkeit von K_m und k_{cat} der Spaltung von GpC durch RNase T_1 in DMG-Puffer bei 25°C

Die pH-Abhängigkeit der kinetischen Parameter zeigt, daß eine pH-Änderung eine parallele Änderung von K_m und k_{cat} im pH-Bereich von pH 4,5 bis pH 7,0 hervorruft. Die Enzymaktivität wird wieder am besten durch den Quotienten k_{cat}/K_m ausgedrückt. Das pH-Profil von k_{cat}/K_m ist deshalb in Abb. 6 gestrichelt miteingezeichnet. Unterhalb von pH 4,5 und oberhalb von pH 7,0 steigt der K_m-Wert an und der k_{cat}-Wert fällt ab. K_m hat zwei Minima, eins bei pH 4,5 und eins bei pH 6,7. k_{cat} hat ein Maximum bei pH 5,4, das mit dem Maximum von K_m zusammenfällt, und ein weiteres bei pH 7,4. Die Signifikanz der Kurve wurde durch fünf unabhängige Meßserien gesichert. Ein analoges Profil findet sich auch bei der pH-Abhängigkeit der Carboxymethylierungs-Reaktion (15).
Das pH-Profil der kinetischen Parameter für die Hydrolyse von G-2':3'-P (27) unterscheidet sich von dem der Umesterung. K_m ist am kleinsten bei pH 5,0 und steigt zur sauren Seite hin langsam an, zur alkalischen Seite hin sehr stark. Im Bereich von pH 7,0 hat die Kurve für den K_m-Wert eine Schulter. Das Maximum des k_{cat}-Wertes, ausgedrückt durch v_{max}, liegt bei pH 7,0. Der v_{max}-Wert fällt zur sauren und alkalischen Seite hin ab. Bei pH 4 findet sich ein zweites kleines Maximum. Abbildung 7 zeigt die pK_m/pH- Profile und das log k_{cat}/pH- bzw. log v_{max}/pH- Profil für beide Schritte.

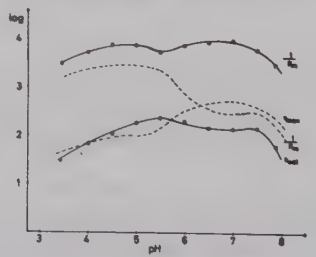


Abb.7: pK_m/pH-, log k_{cat}/pH- und log v_{max}/pH-Profile für die Spaltung von GpC und G-2':3'-P durch RNase T_1

Daraus ist zu ersehen, daß die Unterschiede systematisch sind. Im pH-Bereich von pH 6,0-7,0 hat eine Umkehrung stattgefunden. Das pK_m/pH-Profil der Umesterung entspricht dem log v_{max}/pH-Profil der Hydrolyse und umgekehrt entspricht das log k_{cat}/pH- Profil der Umesterung dem pK_m/pH-Profil der Hydrolyse. Unterhalb von pH 5,5 ist der Verlauf der pK_m/pH- Profile füe beide Katalyseschritte gleich und ab pH 5,0 ist der Verlauf des log k_{cat}/pH- Profils und der des log v_{max}/pH-Profils vergleichbar.
Abbildung 8 zeigt, daß die pK_i/pH- Profile der Inhibitoren 2'-Gp und 3'-Gp sich ebenfalls unterscheiden.

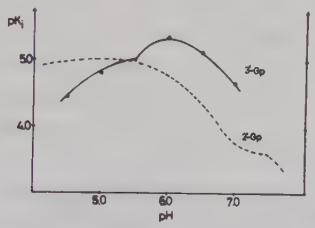


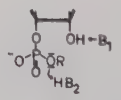
Abb.8: pK_i/pH- Profile für die Hemmung der RNase T_1-Reaktion durch 2'-Gp und 3'-Gp

3'-Gp hemmt am stärksten bei pH 6,5, im Bereich der größten Enzymaktivität und des K_m-Minimums für die Umesterung. Bei pH-Werten unterhalb und oberhalb von pH 7,0 wird eine Aktivierung gefunden. Nach Irie (27) hemmt 2'-Gp am stärksten bei pH 5,0, wo das Minimum des K_m-Wertes für den Hydrolyseschritt liegt.
Bei der RNase A- Katalyse und der RNase T_2-Katalyse (42,43) wurde eine Abhängigkeit der kinetischen Parameter vom verwendeten Puffersystem gefunden. Bei der RNase T_1 ist im Bereich von pH 7,0 - 7,4 eine solche Abhängigkeit nicht gefunden worden.

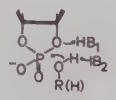
Folgerungen

Im vorhergehenden Abschnitt wurde eine Katalyse ähnlich der

nicht-enzymatischen protonenkatalysierten Reaktion ausgeschlossen. Es wurde weiterhin gezeigt, daß dann eine Aktivierung der 2'-OH-Gruppe durch einen Protonenacceptor des Enzyms und eine Protonierung der P-O-R-Gruppierung durch einen Protonendonor des Enzyms stattfinden muß. Wenn Nucleoside in höherer Konzentration eingesetzt werden, kann die RNase T_1 anstelle der Hydrolyse durch Wasser 3'-5'-Diester mit G-2':3'-P resynthetisieren (10). Wasser (HOH) und Nucleosid (ROH) können sich gegenseitig ersetzen. Der zweite Schritt der Katalyse, die Hydrolyse, muß als die Umkehr des ersten Schrittes, der Umesterung, angesehen werden. Dies bedeutet, daß beide Schritte identische Zwischenzustände durchlaufen. Die Basen-Katalyse im ersten Schritt (IV) ist komplementär der Protonen-Katalyse im zweiten Schritt (V). Umgekehrt ist die Protonen-Katalyse im ersten Schritt komplementär zur Basen-Katalyse im zweiten Schritt.



IV



V

Wenn die Bindung des Guanins in beiden Schritten gleich ist und damit die gleiche pH-Abhängigkeit hat, können folgende Schlüsse gezogen werden: Die k_{cat}-Werte nehmen im ersten Schritt zu, wenn B_1 deprotoniert wird, vorausgesetzt, nur B_1 ist im aktiven Zentrum anwesend. Im zweiten Schritt nehmen die k_{cat}-Werte zu, wenn B_1 protoniert wird. Die gleiche pH-Abhängigkeit würde auch gefunden werden, wenn nur B_2 im aktiven Zentrum vorhanden ist. Wenn B_1 und B_2 im aktiven Zentrum sind und zusammen die Katalyse durchführen, sollte für beide Schritte die gleiche pH-Abhängigkeit gefunden werden. Dies gilt nur, wenn die pK-Werte von B_1 und B_2 gleich sind. Wenn dies nicht der Fall ist, muß die pH-Abhängigkeitskurve des ersten Schrittes mit dem pK-Wert der determinierenden Base abfallen, die des zweiten Schrittes ansteigen.

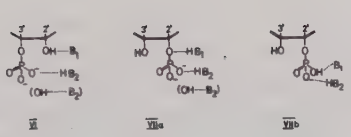
Legt man diese Überlegungen den Abbildungen 7 und 8 zugrunde, dann sollte die pH-Abhängigkeit von K_m in beiden Schritten durch zwei Gruppen mit pK-Werten im Bereich von pH 3,8 und 7,4 bestimmt werden. Zwischen diesen beiden pH-Werten werden keine pK-Werte abgeleitet, da hier K_m eine Funktion von k_{cat} ist. Es kann noch nicht entschieden werden, ob die pK-Werte von 3,8 und 7,4 zu Gruppen gehören, die das Substrat binden oder die kinetisch aktive Konformation bestimmen oder beides gleichzeitig machen.
Bei diesen pH-Werten ist damit zu rechnen, daß infolge der Protonierung bzw. Deprotonierung Konformationsänderungen in inaktive Isomere des Enzyms mit relativ langsamen Umlagerungsgeschwindigkeiten auftreten. Gl.8 drückt dies schematisch aus:

$$E_1 \rightleftharpoons E_a \overset{H^+}{\rightleftharpoons} E_aH \overset{S}{\underset{k_b}{\rightleftharpoons}} E_aHS \xrightarrow{k_{cat}} E_a + H + P \,. \qquad \text{Gl. 8}$$

Wenn k_a kleiner ist als $(k_b + k_{cat})$ und k_{cat} ermittelt wird aus v_o / e_{total} anstatt aus $v_o/(e_{total} - e_1)$, dann können keine pK-Werte vom Abfall von k_{cat} auf der sauren und alkalischen Seite abgeleitet werden.
Aus der pH-Abhängigkeit von k_{cat} für die Umesterung ergeben sich zwei pK-Werte im Bereich von 4,4 und 6,2. Die Gruppe mit einem pK von 4,4 wirkt nach ihrer Deprotonierung als Base, die mit einem pK von 6,2 in der protonierten Form als Säure. Im zweiten Schritt nimmt k_{cat} mit der Deprotonierung einer Gruppe vom pK 6,2 zu, während die Gruppe mit einem pK von 4,4, die nun in der protonierten Form agieren muß, die Reaktion kaum beeinflußt.
Als Arbeitshypothese kann für die Vorgänge an der katalytischen Seite der folgende Mechanismus angenommen werden:
Im ersten Schritt ist B_1 eine Base mit einem pK von 4,4, die die 2'-OH-Gruppe aktiviert. B_2 ist eine Base mit einem pK von 6,2, die in der protonierten Form die Katalyse durchführt. Dem pK-Wert nach kann B_1 nur ein Carboxylat-Anion und B_2 ein Imidazolium-Ion sein.
Im zweiten Schritt aktiviert B_2 in der deprotonierten Form ein Wasser-Molekül. Dies sollte das gleiche Imidazol sein wie das im ersten Schritt am 5'-Sauerstoff angreifende. Die

Protonen-Katalyse durch B_1 bei niedrigen pH-Werten sollte alleine nicht ausreichen, die Hydrolyse durchzuführen. Die Schulter bei pH 4 kann jedoch auf eine zunehmende Konzentration der protonierten Form von B_1 zurückgeführt werden. Aus diesen Überlegungen ergeben sich die folgenden Konsequenzen: Die Wechselwirkung an der katalytischen Seite beeinflußt die Bindung der Substrate verschieden, Während im ersten Schritt B_1 und B_2H an der Bindung des Substrats beteiligt sein können und so den $K_{+1(app)}$-Term erhöhen, kann dies im zweiten Schritt lediglich B_1H durchführen, da B_2 das frei bewegliche Wasser-Molekül aktiviert. Deshalb sind die K_m-Werte für die Umesterung niedriger als für die Hydrolyse. Zum andern kann so das reziproke Verhalten der pK_m/pH- und log k_{cat}/pH- bzw. log v_{max}/pH- Profile im pH-Bereich von 6,0 - 7,0 und das starke Ansteigen von pK_m für die Hydrolyse zum Sauren hin verstanden werden. Die Abdissoziation der bei der Umesterung gebildeten zyklischen 2',3'-Diester sollte sehr schnell sein, da eine Bindungsstelle an der katalytischen Seite verloren geht. Dies kann an der fehlenden Produkthemmung bei der Umesterung gesehen werden. Wenn $k_{+1(app)}$ zwischen pH 4,5 und 7,0 konstant bleibt, dann geht in k_{cat} der Bindungswechsel geschwindigkeitsbestimmend ein und verursacht die Parallelität zwischen K_m und k_{cat} in diesem Bereich.

Im zweiten Schritt ist die Abdissoziation des Produkts 3'-Gp sehr langsam, da an der katalytischen Seite wieder eine zusätzliche Bindungsstelle auftreten kann. Das Maximum von pK_i für die Hemmung von 3'-Gp ist im Vergleich zu dem von 2'-Gp zu höheren pH-Werten verschoben, wo entweder das dianionische Phosphat mit der protonierten Form B_2H reagiert oder das monoanionische Phosphat mit der deprotonierten Form B_2 (VI). Im Gegensatz dazu kann 2'-Gp an der katalytischen Seite durch die protonierte Form B_1H am C-2'-Sauerstoff (VIIa) gebunden werden oder B_1 und B_2H binden an das Phosphat in der monoanionischen Form (VIIb). In beiden Fällen verschiebt sich das Maximum von pK_i für 2'-Gp im Vergleich zu dem für 3'-Gp zur sauren Seite und ist dem pK_m/pH-Profil der Hydrolyse vergleichbar.



VI VIIa VIIb

4. Abhängigkeit der kinetischen Parameter von der Ionenstärke

Die Kinetik enzymatischer Reaktionen wird in wässrigen Reaktionsmedien verfolgt, die nicht ohne Einfluß auf die Konformation des Proteins und den Ablauf der Katalyse sind, so daß alle kinetischen Messungen nur unter genau definierten Bedingungen quantitativ verglichen werden können. Die Variablen des Reaktionsmediums sind: Ionenstärke, Temperatur, Dielektrizitätskonstante, Wasserstoffionenkonzentration und das Puffersystem. Von diesen Variablen sind die Ionenstärke, die Temperatur und die Polarität des Lösungsmittels noch nicht berücksichtigt worden.
Die Ionenstärke beeinflußt im wesentlichen die Stabilität von Bindungen elektrostatischer Art sowie von Wasserstoffbrücken, soweit auch geladene Gruppen daran beteiligt sind. Aus dem vorhergehenden Abschnitt geht hervor, daß die Aminosäuren im aktiven Zentrum der RNase T_1 sehr stark fixiert sein müssen. Wenn dies durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Carboxylat und Imidazolium geschieht, dann sollte eine Änderung der Ionenstärke einen Einfluß auf die Geschwindigkeitskonstanten der Komplexbildung zwischen Substrat und Enzym ausüben.
Abbildung 9 zeigt den Einfluß der Ionenstärke bei pH 4,5 und Abbildung 10 den bei pH 6,5. Die Ionenstärke wurde durch

Zusatz von NaCl zu 0,05 M DMG-Puffer eingestellt. Der Verlauf von k_{cat}/K_m ist gestrichelt mit eingezeichnet.

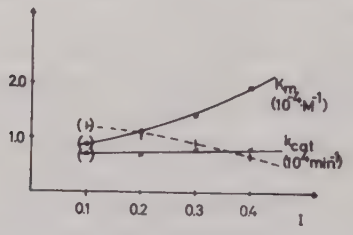


Abb.9: Einfluß der Ionenstärke auf die Spaltung von GpC durch RNase T_1 bei pH 4,5 und 25°C

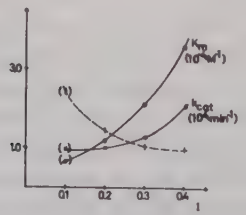


Abb.10: Einfluß der Ionenstärke auf die Spaltung von GpC durch RNase T_1 bei pH 6,5 und 25°C

Die Werte der Ionenstärke 0,1 sind eingeklammert. Die Abwesenheit der Chlorid-Ionen hat zur Folge, daß Sigmoid-Kurven auftreten (Abb.11)

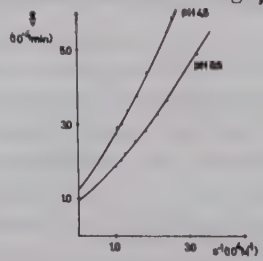


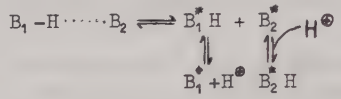
Abb.11: Lineweaver-Burk-plots der GpC-Spaltung bei I=0,1

Man findet den Typ einer Substrataktivierung, die es nicht erlaubt, nach Gl.6 für diese Ionenstärke K_m- und k_{cat}-Werte auszurechnen und mit bei anderen Ionenstärken gemessenen Werten zu vergleichen.
Bei pH 4,5 tritt mit Erhöhung der NaCl-Konzentration der Typus der kompetitiven Hemmung auf, d.h. k_{cat} bleibt unverändert und K_m wird größer. Bei pH 6,5 wird K_m ebenfalls mit zunehmender Ionenstärke größer, jedoch bleibt k_{cat} nicht mehr unverändert. Der Verlauf der $k_{+1(app)}$-Werte zeigt, daß bei pH 6,5 der Einfluß der Ionenstärke bei niedrigeren Werten auftritt als bei pH 4,5.
Die Katalyse der RNase T_1 ist keine Ionenreaktion, so daß nur Überlegungen im Sinne des zweiten Salzeffekts nach Bröndtedt angestellt werden können. Da k_{cat} und K_m komplexe kinetische Parameter einer Mehrstufenreaktion sind, ist eine quantitative Erfassung der obigen Ergebnisse nicht möglich, so daß man sich auf qualitative Aussagen beschränken muß. Eine Änderung der Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion bei Änderung der Ionenstärke kann nach Dixon und Webb (28) durch folgende Einflüsse verursacht werden: 1. Ladungstrennung während der Dissoziation des ES-Komplexes, 2. Senkung der elektrostatischen Abstoßung zwischen E und S, 3. Änderung der Konzentration an aktivem Enzym, z.B.durch Änderung der Lage eines Säure-Basen-Gleichgewichts oder Auflösung einer Wasserstoffbrücke zwischen geladenen Gruppen, 4. Hemmung der zugesetzten Ionen durch Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum. Die erste und die zweite Möglichkeit kann ausgeschlossen werden, da hier eine Erhöhung der Ionenstärke zu einer Geschwindigkeitszunahme führt.

Folgerungen

Chlorid-Ionen in niedriger Konzentration wirken auf die RNase T_1 wie Aktivatoren bei allosterischen Enzym-Systemen, da ihre Anwesenheit die zum Auftreten der Sigmoid-Kurven führende Substrataktivierung aufhebt. Dies bedeutet, daß die Anwesenheit von Chlorid-Ionen eine bestimmte aktive Konformation der RNase T_1 stabilisiert. Die mit weiter zunehmender Ionenstärke auftretende Erhöhung der K_m-Werte kann mit fol-

gendem Schema erklärt werden:



Die Sterne an B_1 und B_2 sollen anzeigen, daß die pK-Werte der beiden Species in der offenen Form anders sind als in der H-Brücken gebundenen geschlossenen Form. Die Ionenstärke beeinflußt dieses Gleichgewicht, indem es die Stabilität der Wasserstoffbrücke senkt. Das hat zur Folge, daß die aktive Form $B_1\text{-H}\cdots B_2$, die im aktiven Zentrum für die spezifische Bindung oder die Katalyse verantwortlich sein sollte, vermindert wird. Daraus resultieren höhere K_m-Werte und der Typ der kompetitiven Hemmung, wenn die spezifische Bindung nicht geschwindigkeitsbestimmend ist. Geht sie in einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt mit ein, so findet man eine unkompetitive Hemmung wie bei pH 6,5. Zwischen pH 4,5 und pH 6,5 sollte also während des Katalyseablaufs der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wechseln. Zur Erklärung der Resultate, die bei Zusatz von Inhibitoren und Modifizierern erhalten wurden, wird dies noch größere Bedeutung erlangen.

Bei pH 4,5 und pH 6,5 reagiert die RNase T_1 nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ unterschiedlich auf die Änderung der Ionenstärke. Diese quantitativen Unterschiede haben ihre Ursache darin, daß man sich bei pH 6,5 in unmittelbarer Nähe des pK-Wertes von B_1H befindet, während man bei pH 4,5 etwas mehr von dem von B_2 entfernt ist. Diese Tatsachen lassen wiederum darauf schließen, daß an der spezifischen Bindung ein gekoppeltes Säure-Basen-Paar beteiligt ist, das aus einem Imidazolium-(B_1H) und einem Carboxylat-Ion (B_2) gebildet wird.

Entscheidende Einflüsse auf die katalytische Seite können hier nicht abgeleitet werden, da die hervorgerufenen Änderungen wesentlich in den K_m-Wert eingehen und sich im $k_{+1(app)}$-Term ausdrücken. Dadurch wird k_{cat} überlagert.

5. Abhängigkeit der kinetischen Parameter vom Dielektrikum

Während eine Erhöhung der Ionenstärke vor allem die Stabilität der Wasserstoffbrücken senkt, wird durch eine Erniedrigung der Dielektrizitätskonstanten des Lösungsmittels eine Stabilisierung hervorgerufen. Gleichzeitig werden die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb des Enzyms beeinflußt, so daß nicht nur netsprechende Rückwirkungen auf Bildung und Stabilität des ES-Komplexes zu erwarten sind, sondern auch solche auf die Gesamtkonformation des Enzyms.
Aus den bisherigen Ergebnissen konnte abgeleitet werden, daß die Kinetik des Katalyseablaufs bei pH 4,5 und pH 6,5 nicht die gleiche ist. Die Abhängigkeit der kinetischen Parameter vom Dielektrikum wurde deshalb ebenfalls bei diesen beiden pH-Werten untersucht. Abbildung 12 zeigt die Änderung von k_{cat} bei Senkung von D. Das Verhalten von K_m bei pH 4,5 und pH 6,5 ist analog zu k_{cat}. Die Senkung von D wurde durch Dioxan-Zusatz erreicht.

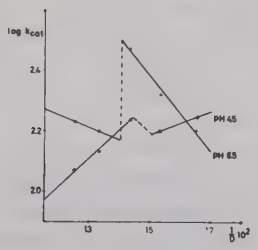


Abb.12: Abhängigkeit von k_{cat} der Spaltung von GpC durch RNase T_1 vom Dielektrikum

Die Diskontinuitäten bei beiden pH-Werten deuten auf Konformationsänderungen hin, die später bei den Flureszenz-Messungen bestätigt werden können.
Für den unmittelbaren Einfluß des Dielektrikums auf den Katalyseablauf sind folgende Punkte zu berücksichtigen (45):

1.Die pK_a-Werte der funktionellen Aminosäuren im aktiven zentrum können durch eine Änderung des Dielektrikums ebenfalls geändert werden. 2. Die Gesamtladung des Enzyms oder die Ladungsverteilung in bzw. in der Umgebung des aktiven Zentrums kann geändert werden, so daß die Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym beeinflußt wird. 3. Die Wechselwirkungen aller Dipole und Ionen des Reaktionsmediums mit dem Enzym werden geändert. 4. Die Konformation des Enzyms ist abhängig von der Polarität des Lösungsmittels. Die Konformation des Substrats kann ebenso abhängig von der Polarität der es umgebenden Wasserhülle sein.
Abbildung 13 zeigt den Einfluß der Lösungsmittelpolarität auf die Hyperchromie des als Substrat eingesetzten 3'-5'-Dinucleosidphosphats GpC bei pH 4,5 und bei pH 6,5.

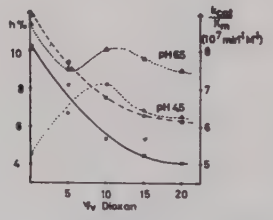


Abb.13: Zusammenhänge zwischen Hyperchromie und k_{cat}/K_m bei der Spaltung von GpC durch RNase T_1 in Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels k_{cat}/K_m ····· ; h% —— (pH 6,5), - - - (pH 4,5)

Die Hyperchromie kann als Maß des "base stackings" angesehen werden, das eine für den Katalyseablauf günstige Vorordnung im Substrat mit sich bringt. In Abschnitt 2 konnte gezeigt werden, daß zwischen der Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit und der Abnahme der Hyperchromie des Substrats bei konstanter Ionenstärke und konstantem Dielektrikum eine Parallelität besteht. Abbildung 13 zeigt, daß eine entsprechende Parallelität nur bei pH 6,5 existiert, wo mit abnehmender Polarität des Reaktionsmediums k_{cat}/K_m abnimmt. Bei pH

4,5 findet sich dieses Verhalten nicht.
Bei der quantitativen Behandlung des Einflusses der Dielektrizitätskonstanten stellt man sie als ihre Wirkung auf die zwischenmolekularen Kraefte dar, wenn sich die Reaktanten auf einen Abstand nähern, der für die Reaktion notwendig ist. Gleichungen, die Beziehungen zwischen den Geschwindigkeitskonstanten und D ausdrücken, sind auf verschiedenen Wegen aufgestellt worden (45,46,47). Obwohl die kinetischen Konstanten der RNase T_1-Reaktion nicht definierten Reaktionsschritten oder -abläufen zugeordnet werden können, sollen hier doch Überlegungen von Laidler (47) auf k_{cat} angewendet werden. Der Zerfall des aktivierten ES - Komplexes kann dargestellt werden als

$$k_{cat} = \frac{R \cdot T}{N \cdot h} \cdot e^{-(\Delta F^*/RT)} \qquad \text{Gl.9}$$

ΔF^* kann in einen elektrostatischen Teil ΔF^*_{es} und einen nicht-elektrostatischen Teil ΔF^*_{nes} zerlegt werden. Nach Logarithmieren von Gl.9 erhält man dann:

$$\log k_{cat} = \log \frac{RT}{Nh} - \frac{\Delta F^*_{nes}}{2.303 \cdot RT} - \frac{\Delta F^*_{es}}{2.303 \cdot RT} \qquad \text{Gl.10}$$

ΔF^*_{es} ergibt sich nach Laidler als

$$\Delta F^*_{es} = 305 \cdot \frac{z_1 \cdot z_2}{d \cdot D} \quad , \qquad \text{Gl.11}$$

wobei z_1 und z_2 die Ladungen der beiden Reaktanten sind und d ihr Abstand voneinander im aktivierten Komplex. Eingesetzt in Gl.10 erhält man dann:

$$\log k_{cat} = \log \frac{RT}{Nh} - \frac{\Delta F^*_{nes}}{2.303 \cdot RT} - 214 \cdot \frac{z_1 \cdot z_2}{d \cdot D} \qquad \text{Gl.12}$$

Trägt man wie in Abbildung 12 log k_{cat} gegen 1/D auf, so ist die Steigung der Geraden gleich $-214 z_1 z_2 / d$ und der Schnittpunkt auf der log k_{cat}-Achse gleich log RT/Nh - $\Delta F^*_{nes}/2{,}303$ RT. Für die Ausrechnung der thremodynamischen Größen wurde nur der Teil der Geraden ausgewertet, der vor dem Auftreten der Diskontinuität liegt, da nur die Ergeb-

nisse vor dem Auftreten der Konformationsänderung des Proteins mit den Daten der Ionenstärke- und der Temperaturänderung vergleichbar sind. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tabelle 3

pH	ΔF^*_{nes} (kcal/mol)	ΔF^*_{es} (cal/mol)
4,5	16,9	17,8
6,5	17,0	7,1

Der Hauptteil der Aktivierungsenergie liegt bei pH 4,5 und pH 6,5 im nicht-elektrostatischen Anteil. Die entgegengesetzte Steigung der Geraden bei den beiden pH-Werten besagt, daß bei pH 6,5 die Gesamtladung des aktiven Zentrums gleich der des Substrats, d.h. negativ ist, da das Produkt aus z_1 und z_2 hier positiv ist. Bei pH 4,5 ist das Produkt $z_1 z_2$ hingegen negativ, d.h. die Gesamtladung des aktiven Zentrums ist nun neutral oder positiv. Die durch die abnehmende Polarität verringerte Abschirmung der elektrostatischen Kräfte zwischen Protein und Substrat bewirkt deshalb bei pH 6,5 eine Abnahme und bei pH 4,5 eine Zunahme von k_{cat}.

Folgerungen

Der Hauptteil der für die Reaktion benötigten Aktivierungsenergie ist nicht elektrostatisch. Die Hauptaktivierungsenergie sollte deshalb für eine Umorientierung des aktiven Zentrums im Sinne des "induced fit" benötigt werden. Dies steht im Einklang mit der hohen Stereoselektivität des Enzyms. Die Fluoreszenz-Messungen werden hier noch weitere Anhaltspunkte liefern. Die durch die Hyperchromie angezeigte Vorordnung des Substrats ist für die Größe der Gesamtumsetzungsgeschwindigkeit von untergeordneter Bedeutung. Bei pH 4,5 und pH 6,5 sollte der Katalyseablauf nicht gleich sein, da das Dielektrikum einen unterschiedlichen Einfluß hat. Die Gesamtladung des aktiven Zentrums hat bei pH 4,5

ein positives Vorzeichen und bei pH 6,5 ein negatives Vorzeichen. Dies weist wiederum darauf hin, daß das an der katalytischen Seite angenommene Säure-Basen-System aus einem Carboxylat-Ion und einem Imidazolium besteht. Wenn man die aus der pH-Abhängigkeit abgeleiteten pK-Werte von 4,4 und 6,2 zugrunde legt, ergibt sich (Abb.14), daß bei pH 4,5 die katalytische Seite positiv geladen ist und bei pH 6,5 negativ entsprechend dem jeweiligen Gleichgewicht zwischen den deprotonierten und protonierten Formen. Unter der Voraussetzung, daß die Gesamtladung im gebildeten Komplex sich bei diesen pH-Werten nicht geändert hat, bestätigen die gefundenen Daten die bisherigen Schlußfolgerungen.

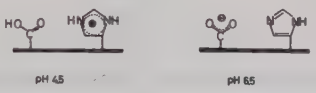


Abb.14: Bevorzugtes Gleichgewicht der katalytischen Seite des aktiven Zentrums der RNase T_1 bei pH 4,5 und 6,5

Die unterschiedliche Steigung hat ihren Grund in einer unterschiedlichen Größe der absoluten Gesamtladung des aktiven Zentrums, da die pH-Werte nicht gleichen Abstand von den pK-Werten haben. Zum andern kann der parallele Gang mit der Hyperchromie des Substrates bei pH 6,5 den Abfall der Geraden verstärken, während er bei pH 4,5 antiparallel ist und den Antsieg der Geraden vermindern sollte.

Nach dem für die spezifische Bindungsseite geforderten B-H···B- System muß erwartet werden, daß an dieser Seite keine Ladungsänderung stattfindet. Ein Teil des ΔF^*_{nes} sollte in die hydrophobe Wechselwirkung des 6-Hydroxy-Purins und der 5'-Base mit den aromatischen Aminosäuren im aktiven Zentrum des Proteins eingehen. Dies können Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin sein. Hierüber liefern die durchgeführten Fluoreszenz- und Kernresonanz-Messungen nähere Aussagen.

6. Abhängigkeit der kinetischen Parameter von der Temperatur

Aus der Temperaturabhängigkeit der kinetischen Parameter können Aussagen über die Thermodynamik der Reaktion gemacht werden. Die Abbildungen 15 und 16 zeigen den Verlauf von log k_{cat} und log K_m gegen 1/T bei pH 7,0 und pH 4,5. Die Unterschiede zwischen beiden pH-Werten sind signifikant.

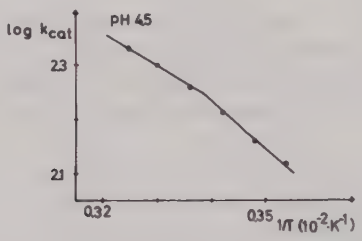


Abb15: Temperaturabhängigkeit der GpC-Spaltung durch RNase T_1 bei pH 4,5

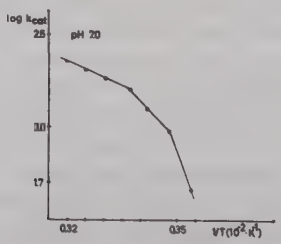


Abb.16: Temperaturabhängigkeit der GpC-Spaltung durch RNase T_1 bei pH 7,0

Nach Eyring (48) läßt sich aus der Temperaturabhängigkeit die für die Reaktion benötigte Aktivierungsenergie ausrechnen. Danach gilt für k_{cat} unter der Voraussetzung, daß die Geschwindigkeit der Reaktion bei einer bestimmtem Temperatur abhängt von der Konzentration eines energiereichen aktivierten Komplexes, der im Gleichgewicht mit den nicht ak-

tivierten Reaktionspartnern steht:

$$k_{cat} = (k_B/h) \cdot T \cdot K^{\neq} \qquad \text{Gl.13}$$

Mit $RT\ln K^{\neq} = -\Delta F^{\neq} = T\Delta S^{\neq} - \Delta H^{\neq}$ Gl.14

folgt $$\ln k_{cat} = \ln (k_B/h) + \ln T - \frac{\Delta F^{\neq}}{RT} \qquad \text{Gl.15}$$

Für die Temperaturabhängigkeit von k_{cat} gilt dann:

$$\frac{d(\ln k_{cat})}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H^{\neq} + RT}{R} \qquad \text{Gl.16}$$

bzw.

$$d(\log k_{cat}) = -\frac{\Delta H^{\neq} + RT}{2.303 \cdot R} \cdot d(1/T) \qquad \text{Gl.17}$$

$\Delta S^{\neq}$ läßt sich ausrechnen nach:

$$\Delta S^{\neq} = \frac{\Delta H^{\neq} - \Delta F^{\neq}}{T} \qquad \text{Gl.18}$$

In Tabelle 4 sind die so ausgerechneten Werte für $\Delta F^{\neq}$, $\Delta H^{\neq}$ und $\Delta S^{\neq}$ für beide pH-Werte und charakteristische Temperaturen wiedergegeben.

Tabelle 4

pH 7,0				pH 4,5			
T(°C)	$\Delta H^{\neq}$ ($\frac{kcal}{mol}$)	$\Delta F^{\neq}$ ($\frac{kcal}{mol}$)	$\Delta S^{\neq}$(e.u.)	T(°C)	$\Delta H^{\neq}$ ($\frac{kcal}{mol}$)	$\Delta F^{\neq}$ ($\frac{kcal}{mol}$)	$\Delta S^{\neq}$(e.u.)
35	6,50	17,2	-34,8	35	5,50	17,4	-41,7
20	8,25	16,9	-29,1	20	6,56	16,8	-37,9
10	23,40	16,9	+23,0	10	6,60	16,4	-38,8

Während der Betrag der freien Aktivierungsenergie sich kaum ändert bei einem Übergang von pH 7,0 zu pH 4,5, ändert sich der Enthalpie-Term und entsprechend der Entropie-Term. Der aus den bisherigen Daten geschlossene unterschiedliche Katalyseablauf kommt hier wieder zum Ausdruck.

Wenn man die Temperaturabhängigkeit des kinetischen Parameters k_{cat} einer Mehrstufenreaktion, wie sie bei der RNase T_1-Katalyse vorliegt, untersucht, so ist zu berücksichtigen, daß die Einzelkonstanten, aus denen sich k_{cat} zusammensetzt, einen unterschiedlichen Temperaturkoeffizienten haben können. Der Einzelschritt, der einen höheren Temperaturkoeffizienten

hat, wird bei höheren Temperaturen der schnellere, so daß die Gesamtgeschwindigkeit nun durch einen andern Schritt bestimmt wird. Die Aktivierungsenergie des letzteren ist dann diejenige, die beobachtet wird. Daraus resultieren Knickpunkte in der log k_{cat}-1/T-Kurve. Die Aktivierungsenergie wird bei höheren Temperaturen niedriger.
Wenn das gemessene k_{cat} sich jedoch nicht nur aus Geschwindigkeitskonstanten, sondern auch aus Gleichgewichtskonstanten zusammensetzt, kommt es zu einem Verlauf wie in Abb.15 und 16, ohne daß die Aktivierungsenergie sich ändert. Tabelle 4 zeigt, daß das der Fall ist. Die Änderungen der Enthalpie sind zurückzuführen auf den Temperatureinfluß auf die Gleichgewichtskonstanten, die in k_{cat} eingehen(49).
Die bei der Spaltung von GpC gefundenen thermodynamischen Daten entsprechen dem Ergebnis, daß bei der Substratvariation K_m als f(k_{cat}) dargestellt werden kann, d.h. daß K_m und k_{cat}, Gleichgewichtskonstante und Überalles-Geschwindigkeitskonstante, unmittelbar miteinander verknüpft sind. Um hier noch weiteren Aufschluß zu erhalten, wurde bei pH 7,0 die Kopplung von k_{cat} und K_m noch näher untersucht, indem auch die Temperaturabhängigkeit der Spaltung von GpA, GpU und IpC bei pH 7,0 gemessen wurde.Abbildung 17 zeigt das Ergebnis.

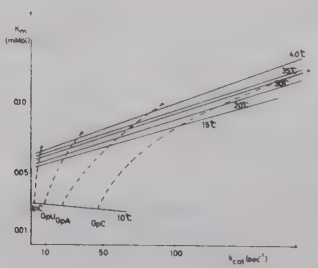


Abb.17: Temperaturabhängigkeit der Kopplung von k_{cat} und K_m

Die gestrichelten Pfeile sollen andeuten, daß die K_m-Werte bei einer Temperaturerhöhung immer weiter auseinanderrücken, während das relative Verhältnis der k_{cat}-Werte zueinander sich kaum ändert. Bei 10°C ist die Beziehung zwischen k_{cat}

und K_m nicht analog zu denen bei höherer Temperatur. In Tabelle 5 sind die ΔH^*-, ΔF^*- und ΔS^*- Werte für die Spaltung von GpC, GpA, GpU und IpC durch die RNase T_1 bei 25°C wiedergegeben.

Tabelle 5

Substrat	$\Delta H^*(\frac{kcal}{mol})$	$\Delta F^*(\frac{kcal}{mol})$	ΔS^*(e.u.)
GpC	6,50	17,0	- 34,6
GpA	4,75	17,6	- 43,2
GpU	2,48	18,3	- 53,1
IpC	1,76	19,3	- 59,0

Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, daß die Erhöhung der freien Aktivierungsenergie beim Übergang von GpC zu IpC als Substrat sich in einer Änderung von ΔH^* und ΔS^* spiegelt. Die Geschwindigkeitsänderung geht also in den Enthalpie- und Entropie-Term ein. Die relative Änderung des Enthalpie-Terms ist größer als die des Entropie-Terms.

Folgerungen

Der aus den vorherigen Daten (pH,I,D) gezogene Schluß, daß bei pH 4,5 und pH 6,5 der Reaktionsablauf nicht gleich ist, kann durch die thermodynamischen Daten bestätigt werden. Die bei beiden pH-Werten benötigte freie Aktivierungsenergie differiert nur wenig, dafür jedoch die jeweiligen ΔH^*- und ΔS^* - Terme erheblich. Das heißt, daß nicht nur ein anderer Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist, sondern auch daß der aktivierte ES^* - Komplex aus einem andern ES-Grundzustand gebildet wird. Die thermodynamischen Daten bestätigen, daß K_m keine reine Gleichgewichtskonstante und k_{cat} keine reine Geschwindigkeitskonstante ist. Die thermodynamische Konsequenz der Kopplung von K_m und k_{cat} ist offensichtlich.
Die Geschwindigkeitsänderungen gehen in den Entropie- und in den Enthalpie-Term ein, wobei die relative Änderung des Enthalpie-Terms entscheidender ist. Er ändert sich von GpC zu IpC um einen Faktor von 3,5, der Entropie-Term hingegen

lediglich um einen Faktor von 1,7. Dies zeigt, daß die durch die Hyperchromie angezeigte Vorordnung von untergeordneter Bedeutung ist. Die Abnahme des pK-Wertes von G zu I kann ebenfalls nicht entscheidend sein, da sich sonst ein Sprung in den ΔH^*- Werten beim Übergang von den 3'-Guanylsäure-Diestern zu denen der 3'-Inosinsäure zeigen sollte.
Die in den Abschnitten 4, 5 und 6 gefundenen Ergebnisse lassen darauf schließen, daß neben der Ausbildung spezifischer Wasserstoffbrücken und dem stattfindenden Protonentransfer auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Protein und Substrat die Geschwindigkeit der Katalyse beeinflussen.
Die im Vergleich zu den anderen Temperaturen abweichenden Größen von ΔH^* und ΔS^* bei 10°C und die Änderung der Beziehung $f(k_{cat}) = K_m$ deuten daraufhin, daß bei der RNase T_1 beim Übergang von 20°C zu 10°C eine größere Konformationsänderung stattfindet. Ein weiterer Anhaltspunkt dafür sollte sein, daß die Synthese am besten mit der RNase T_1 bei 10°C und pH 7,0 abläuft (10). Zusammen mit den gefundenen Diskontinuitäten in Abschnitt 5 deutet dies darauf hin, daß die Konformation der RNase T_1 labil und abhängig von den Variablen des Reaktionsmediums ist.

D. Strukturuntersuchungen an der RNase T_1

Die kinetischen Messungen können nur Aussagen geben über den funktionellen Ablauf der Katalyse. So konnte gezeigt werden, daß der Typ einer Säurekatalyse für die RNase T_1 nicht in Frage kommt, sondern daß eine gleichzeitige Säuren-Basen-Katalyse in Form einer Mehrzentren-Reaktion stattfindet. Über die an der Reaktion beteiligten Aminosäuren und ihre Rolle bei der Katalyse konnten konkrete Vorstellungen entwickelt werden. Jedoch läßt die Kinetik nur indirekte Schlüsse zu. Direkte Aussagen über die an der Katalyse beteiligten Imidazole und ihre unmittelbare Umgebung lassen sich durch die Kernresonanz-Spektroskopie erhalten. Die kinetischen Messungen deuteten daraufhin, daß die RNase T_1 pH-abhängige Konformationsänderungen eingeht und daß das Substrat eine Konformationsänderung zur Ausbildung der kinetisch aktiven Species induziert. Über eine Beteiligung der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan an diesen Prozessen kann die Fluoreszenz-Spektroskopie Auskunft geben. Die Existenz von Wasserstoffbrücken für die formulierten B-H···B-Systeme kann mit der Differenz-Spektroskopie nachgewiesen werden.

Eine Kombination dieser drei spektroskopischen Methoden ermöglicht es, näheren Aufschluß über die Strukturelemente der RNase T_1 zu erhalten. Einflüsse des Reaktionsmediums und des Substrats auf das aktive Zentrum und seine nähere Umgebung können direkt bestimmt werden. Auf diesem Wege können die Zusammensetzung des aktiven Zentrums und die Wechselwirkungen der funktionellen Aminosäuren mit dem Protein-"backbone" aufgedeckt werden.

Bevor auf die mit den einzelnen Methoden erhaltenen Resultate eingegangen werden soll, ist es notwendig, auf die Primärstruktur der RNase T_1 näher einzugehen, da sich hieraus wichtige Anhaltspunkte ergeben. Abbildung 18 zeigt die von Takahashi (50) aufgeklärte Primärsequenz.

Die beiden Cystin-Brücken befinden sich am Anfang und Ende der Aminosäureketten, so daß eine Sequenz von 90 Aminosäuren resultiert (Tyr11 - Glu 102), deren Tertiärstruktur nur durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen sowie

durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden kann. Die vorhandenen Tyrosine und die sauren Aminosäuren sind nicht statistisch verteilt, sondern treten gehäuft in der Sequenz Tyr11 - Try59 auf. 7 von 9 Tyrosinen und 7 von 12 sauren Aminosäuren befinden sich in diesem Sequenzabschnitt. Die Umgebung von Glutaminsäure 58, die sich im aktiven Zentrum der RNase T_1 befindet (14), ist Pro-Tyr-Tyr-Glu-Try-Pro, wobei die Eingrenzung von zwei Prolinen bedeutet, daß diese Sequenz nicht in einer geordneten Helix-Struktur vorliegen kann. Diese Tatsachen deuten daraufhin, daß die RNase T_1 aus einem polaren und einem unpolaren Teil aufgebaut ist und daß am Aufbau des aktiven Zentrums Tyrosine und das einzige Tryptophan beteiligt sind.

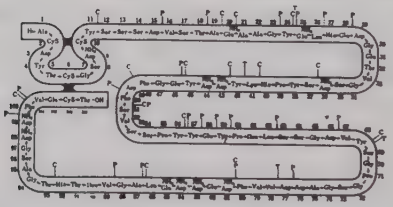


Abb.:18: Die Primärsequenz der RNase T_1

1. Ergebnisse der Kernresonanz-Spektroskopie

Mit einem hochauflösenden Gerät ist es möglich, NMR-Spektren kleiner Proteine (MG 10000 - 25000) aufzunehmen . Unter geeigneten Bedingungen geben die aromatischen Aminosäuren gut beobachtbare Signale bei niedrigem Feld (51). Die NMR-Spektren der RNase T_1 wurden in 0,005 molarer Konzentration in D_2O mit einem Varian HA 100 Gerät in Verbindung mit einem C 1024 CAT aufgenommen. Es wurden durchschnittlich 50 - 70 Spektren gespeichert und dann als time average ausgeschrieben. Es ist nur der Bereich von 940 - 690 cps bezogen auf TMS als externer Standard vermessen worden. In diesem Bereich liegen die Signale der aromatischen Protonen der Aminosäuren Histidin, Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan. Im Bereich von 700 - 750 cps finden sich die Signale des Tyrosins und des Phenylalanins, bei 765 cps das des C-2-Protons des Tryptophans (52). Am weitesten nach niedrigem Feld verschoben ist das Signal für das C-2-Proton des Imidazolringes von Histidin. Seine Lage hängt vom Protonierungszustand des Imidazolringes ab. Ist das Imidazol deprotoniert, so findet sich das Signal für das C-2-Proton bei 820 cps;ist es protoniert, so findet sich das C-2-Signal bei 920 cps. Trägt man nun die chemische Verschiebung gegen den pH-Wert auf, so erhält man eine Titrationskurve und daraus den pK-Wert des betreffenden Imidazols am freien Enzym (53). Liegt das Imidazol gebunden zu einer anderen Gruppe des Enzyms vor, so resultiert ein C-2-Signal, dessen Lage durch Ladung und Basizität bzw. Acidität der anderen Gruppe bestimmt wird. Besteht ein Gleichgewicht zwischen gebundener und nicht gebundener Form, so erhält man ein mittleres Signal, wenn das Gleichgewicht sich schnell genug einstellt, d.h. schneller als 10^{-3} Sekunden. Nach Zusatz eines Inhibitors kann sich der pK-Wert des Imidazols ändern, wenn es an der Bindung beteiligt ist. Das Ausmaß der chemischen Verschiebung des C-2-Signals kann sich ändern, wenn infolge der Bindung die Umgebung des Imidazols verändert wird,und infolge der Einschränkung der Beweglichkeit kann eine Linienverbreiterung auftreten.
Entsprechende Untersuchungen an der RNase A, in deren akti-

vem Zentrum die Histidine 12 und 119 anwesend sind (54), haben zu eindeutigen Aussagen über die Beteiligung dieser Histidine am Bindungsprozeß geführt (55,56,57). Die RNase T_1 enthält 3 Histidine. Den Ergebnissen der kinetischen Messungen zufolge sollten zwei davon im aktiven Zentrum lokalisiert sein. Abbildung 19 zeigt typische NMR-Spektren der RNase T_1 bei verschiedenen pH-Werten. Die angegebenen pH-Werte sind unkorrigierte pD-Werte.

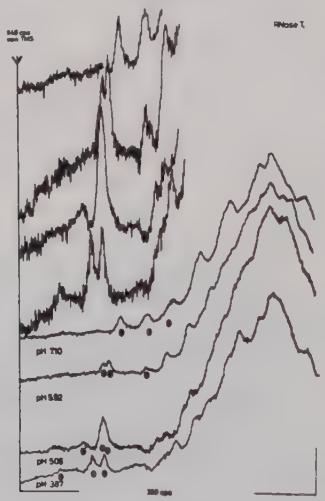


Abb.19: NMR-Spektren der RNase T_1 im Bereich von 940 - 690 cps (vert. range 2^{12} und 2^{14})

Die Signale für die C-2-Protonen von zwei Histidinen sind relativ scharf, während das Signal für das C-2-Proton des dritten wesentlich kleiner und breiter ist. Durch seine pH-bedingte Wanderung läßt es sich jedoch eindeutig identifizieren.

Abbildung 20 zeigt die pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der Signale für die C-2-Protonen der Histidine im Bereich von pH 3,5 bis pH 7,6. Das C-2-Signal für Histidin 1 liegt bei pH 7,6 bei 820 cps und wandert bei Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration bis 920 cps. Es verhält sich damit völlig normal wie entsprechende Modellsubstanzen.

Der pK-Wert ist relativ niedrig und liegt bei pH 5,5. Das C-2-Signal von Histidin 2 findet sich bei pH 3,5 bei 890 cps und fällt mit Erhöhung des pH-Wertes auf 865 cps, bleibt dort im pH-Bereich von pH 4,8 - 6,5 stehen und fällt dann auf 850 cps. Das C-2-Signal für Histidin 3 findet sich bei pH 3,5 bis pH 6,2 bei 868 cps und beginnt dann zu fallen und erreicht bei pH 7,6 die Lage der C-2-Signale freier deprotonierter Imidazole bei 820 cps.Für Histidin 3 ergibt sich ein pK-Wert von 6,8.

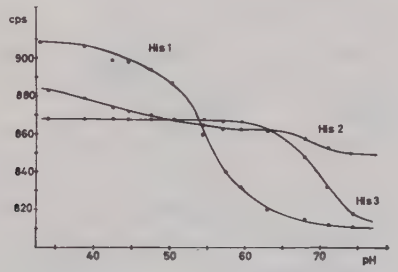


Abb.20: Titrationskurven der C-2-Signale der drei Histidine der RNase T_1

Im Vergleich zur RNase A liegt das Hauptsignal der aromatischen Protonen der Tyrosine nicht bei 750 cps (55), sondern ist um 25 cps zu höherem Feld verschoben und liegt bei 725 cps. Die Strukturierung der aromatischen Protonen von Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan ist pH-abhängig (sh. Abb. 19).
Setzt man bei pH 5,7 dem Enzym Guanin, Guanosin und 3'-Guanylsäure zu, so findet man praktisch keine Verschiebung der C-2-Signale (Abb.21). Das C-2-Signal für Histidin 1 findet sich nicht immer bei gleicher Feldstärke, da der pH-Wert der einzelnen Lösungen nicht immer genau gleich pH 5,70 war und geringfügige Abweichungen (+ 0,01 pH)von pH 5,70 die Lage dieses Signals empfindlich beeinflussen, da man sich in der Nähe des pK-Wertes von Histidin 1 befindet.
Im bereich der Signale der aromatischen Protonen von Tryptophan und Tyrosin treten jedoch starke Veränderungen auf. Zwischen Base, Ribosid und Ribotid lassen sich jedoch keine

Unterschiede herauslesen, die eindeutig der Ribose oder Ribosephosphat oder Phosphat alleine zuzuschreiben wären.

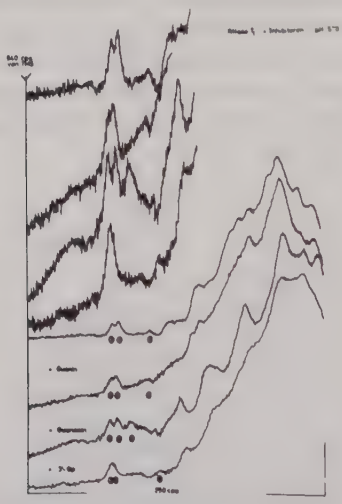


Abb.21: NMR-Spektren der RNase T_1 bei Zusatz von Guanin, Guanosin und 3'-Guanylsäure bei pH 5,70 (vert.range 2^{12} und 2^{14})

Abbildung 22 zeigt, daß bei Zusatz von 30% 3'-Gp die Veränderung der Signale im cps-Bereich von 800 - 690 schon sehr ausgeprägt ist und es dazu nicht erst einer vollen Sättigung bedarf (100% 3'-Gp).
Ähnliches findet man auch bei Zusatz von Guanin und Guanosin (Abb.23). Es fällt auf, daß bei Guanosin-Zusatz das Signal des Histidin 1 größer und schärfer wird.
Die Titrationskurven der C-2-Signale der drei Histidine werden durch Zusatz von Guanosin und Guanin praktisch nicht verändert. Bei Zusatz von 3'-Gp (Abb.24) zeigt sich dagegen, daß die Wanderung des C-2-Signals von Histidin 3 zu höherem Feld erst bei höheren pH-Werten einsetzt, so daß der pK-Wert auf 7,8 steigt.Das C-2-Signal von Histidin 2 beginnt schon ab pH 6,2, bei einem niedrigerem pH-Wert also, auf

850 cps zu fallen. Das C-2-Signal von Histidin 1 bleibt unbeeinflußt.

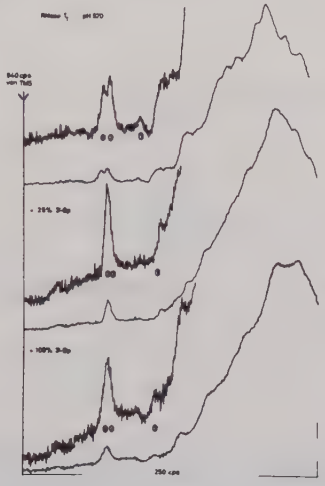


Abb.22: NMR-Spektren der RNase T_1 bei Zusatz von 30% und 100% 3'-Gp bei pH 5,70 (vert.range 2^{12} und 2^{14})

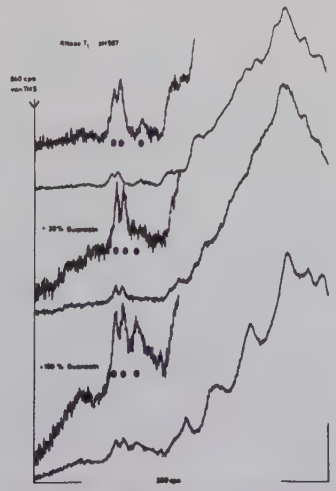


Abb23: NMR-Spektren der RNase T_1 bei Zusatz von 30% und 100% Guanosin bei pH 5,70 (vert.range 2^{12}und 2^{14})

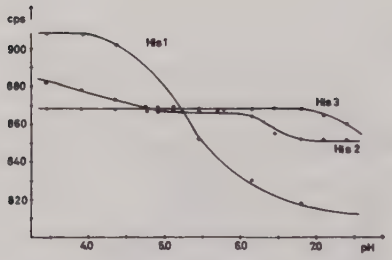


Abb.24: Titrationskurven der C-2-Signale der Histidine der RNase T_1 bei Zusatz von 3'-Gp

Folgerungen

Die C-2-Protonen von Histidin 2 und 3 sind in einer völlig verschiedenen magnetischen Umgebung im Vergleich zu dem von Histidin 1. Während der C-2-Peak von Histidin 3 sich nach der Deprotonierung des Imidazols normal verhält, ist dies bei Histidin 2 nicht der Fall. Die chemische Verschiebung des C-2-Signals von Histidin 3 um 40 cps zu höherem Feld deutet daraufhin, daß sich dieses Histidin in Nachbarschaft zu einer negativ geladenen Gruppe befindet. Da bis zu einem pH-Wert von 3,5 keine Verschiebung zu niedrigerem Feld eintritt, sollte diese Gruppe die Carboxylat-Gruppe einer Asparaginsäure sein. Da nur der Zusatz von 3'-Gp einen Einfluß auf dieses Histidin ausübt, nicht aber der von Guanin oder Guanosin, kann geschlossen werden, daß das Imidazol dieses Histidins in der protonierten Form zu der negativ geladenen Phosphat-Gruppe so bindet, wie es vorher zum Carboxylat-Ion gebunden war. Die stärkere Basizität des Phosphats erklärt, warum erst bei höherem pH-Wert eine Verschiebung des C-2-Signals dieses Imidazols zu höherem Feld auftritt, d.h. der scheinbare pK-Wert höher ist als im freien Enzym.

Die bei der Bindung des Imidazols an die Phosphat-Gruppe

freigesetzte Carboxylat-Gruppe kann an die C-2'-OH-Gruppe des Inhibitors binden. In Abbildung 25 sind diese Verhältnisse wiedergegeben.

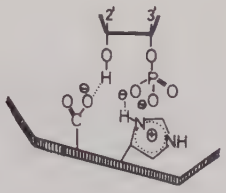


Abb.25: Wechselwirkung zwischen 3'-Gp und der katalytischen Seite des aktiven Zentrums der RNase T_1

Bei der Hydrolyse muß von Histidin 3 die Wasseraktivierung übernommen werden. Diese kann nur durchgeführt werden, wenn das Imidazol freigesetzt worden ist und damit in der deprotonierten Form vorliegt. Dies erklärt die Verschiebung des Aktivitätsmaximums der RNase T_1 von pH 6,5 auf pH 7,0, wenn man von der Umesterung (1.Schritt der Katalyse) zur Hydrolyse (2.Schritt) übergeht.
Das C-2-Signal von Histidin 2 zeigt im Gegensatz zu dem von Histidin 3 schon bei pH 4,6 eine Wanderung zu niedrigerem Feld. Der pK-Wert dieser Carboxylat-Gruppe muß demnach bei 4,2 liegen. Offensichtlich handelt es sich hier um eine Glutaminsäure. Es sollte dies die bei der Carboxymethylierung der RNase T_1 identifizierte Glutaminsäure 58 sein (14). Mit der eintretenden Deprotonierung des Imidazols tritt jedoch keine Normalisierung ein. Es muß deshalb in der Nachbarschaft dieses Imidazols neben dem Protonenacceptor Carboxylat-Ion noch ein Protonendonor stehen, der die beginnende Deprotonierung aufhebt. Dies kann von einem Tyrosin durchgeführt werden. Dafür spricht, daß ab pH 6,30 eine zunehmende Strukturierung des NMR-Spektrums im Tyrosin-Bereich auftritt (750 - 700 cps). Weitere Hinweise dafür werden aus den Fluoreszenz-Messungen erhalten werden. Dieses Imi-

dazol zusammen mit der Glutaminsäure und einem Tyrosin sollte für die spezifische Bindung an der Carbamid-Gruppe der Base verantwortlich sein, so daß Abbildung 4 erweitert werden kann zu Abbildung 26.

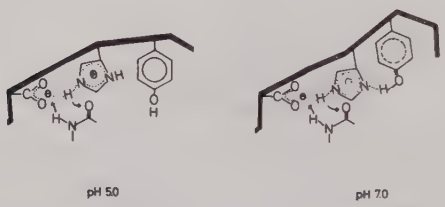


Abb.26: Die spezifische Bindungsseite der RNase T_1 bei pH 5,0 und pH 7,0

Bei der spezifischen Bindung der Base geht das Imidazol eine Wechselwirkung mit einem stärker mesomerie-stabilisierten System ein als im freien Enzym. Daraus folgt, daß das C-2-Signal für Histidin 2 bei Zusatz von 3'-Gp bei niedrigeren pH-Werten sich zu höherem Feld verlagert, d.h. der pK-Wert dieses Imidazols wird gesenkt. Die Bandweiten des C-2-Signals von Histidin 2 werden größer, was eine größere Festlegung des Imidazols anzeigt.
Das C-2-Signal von Histidin 1 verhält sich bei pH-Änderung normal und wird durch Zusatz von Guanin, Guanosin und 3'-Gp in seiner Lage nicht beeinflußt. Seine schwache Intensität und große Bandweite deuten darauf hin, daß dieses Imidazol sich mehr im Innern des Proteins befindet oder zumindest eingeklemmt ist zwischen anderen nicht bindenden Gruppen, die seine Protonierung nicht behindern. Der niedrige pK-Wert sollte durch eine in der Nähe stehende positiv geladene Gruppe verursacht sein.
Bei Zusatz von Guanosin wird das C-2-Signal von Histidin 1 zunehmend schärfer. Dies bedeutet, daß die Beweglichkeit dieses Histidins zunimmt, was eine durch den Guanosin-Zusatz hervorgerufene Konformationsänderung anzeigt. Vergleich-

bare Konformationsänderungen finden ebenso statt bei Guanin- und 3'-Gp-Zusatz und bei pH-Änderung, wenn sich zum Beispiel Histidin 2 zu einem Tyrosin hin orientiert. Hiermit geht auch eine Änderung der Signale der aromatischen Protonen von Tryptophan und Tyrosin einher. So ist z.B. bei Zusatz der 3 Inhibitoren das Signal des C-2-Protons des Tryptophans nicht mehr zu sehen. Daraus muß gefolgert werden, daß die Aufspaltung der Carboxylat-Imidazolium-Komplexe nicht als ein isolierter Vorgang betrachtet werden darf, sondern zu neuen Konformationen führt, in denen manche Gruppen freier, andere jedoch wieder stärker fixiert werden.
Die Verschiebung der Signale der aromatischen Protonen der Tyrosine zu höherem Feld im Vergleich zur RNase A zeigt an, daß sich in der Umgebung mehrerer Tyrosine negative Gruppen befinden, die in diesem Fall nur Carboxylat-Ionen sein können. Die Fluoreszenz-Messungen werden darüber weiteren Aufschluß geben.

2. Ergebnisse der Fluoreszenz-Spektroskopie

Um die aus den Kernresonanz-Messungen erhaltenen Ergebnisse über die direkte bzw. indirekte Beteiligung aromatischer Aminosäuren am Katalyseablauf zu untermauern, wurde die Fluoreszenz der RNase T_1 näher untersucht. Die Fluoreszenz-Intensität (oder Quantenausbeute) ist eine empfindliche Größe die die Wechselwirkung von Enzymen mit Substraten und Inhibitoren zu studieren ermöglicht (58,59). Die Fluoreszenz-Spektren von Proteinen werden wesentlich bestimmt durch die Fluoreszenz der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, wobei die des Tryptophans meistens überwiegt (60). Die Fluoreszenz von Phenylalanin kann nicht beobachtet werden in Proteinen, die Tyrosin und Tryptophan enthalten.
Die Fluoreszenz-Intensität der Tyrosin- und Tryptophan-Chromophore wird durch spezifische Wechselwirkungen mit der Umgebung (61) und durch das Lösungsmittel beeinflußt (62,63). Die Emissions-Maxima der Tyrosin- und Tryptophan-Fluoreszenz liegen meist etwa 50 nm auseinander, so daß unter gün-

stigen Umständen beide Emissionen getrennt gemessen werden können.
Die Fluoreszenz-Emissions-Spektren der RNase T_1 wurden mit einem Aminco-Bowman Spektrofluorometer (64) aufgenommen. Sie geben die Fluoreszenz-Intensität als eine Funktion der Emissions-Wellenlänge wieder, wobei der Übergang vom untersten Schwingungszustand des ersten angeregten Zustandes zum Grundzustand erfaßt wird. Dieser Parameter ist empfindlich gegenüber den erwähnten Beeinflussungen, wenn in unmittelbarer Nähe die Komplexbildung zwischen Enzym und Substrat stattfindet (65).
Das Emissions-Spektrum der RNase T_1 (Abb.27) mit einem Maximum bei 340nm entspricht dem anderer Proteine (60). Es findet sich keine Emissions-Bande für die Tyrosine, deren Fluoreszenz sehr stark gelöscht ist. Bei 50% Dioxan-Zusatz verschiebt sich das Maximum der Tryptophan -Emission zu 360 nm entsprechend einer Normalisierung bezüglich der Fluoreszenz-Eigenschaften von Tryptophan in wässriger Lösung. Bei allen Fluoreszenz-Messungen wurde bei 280 nm angeregt.

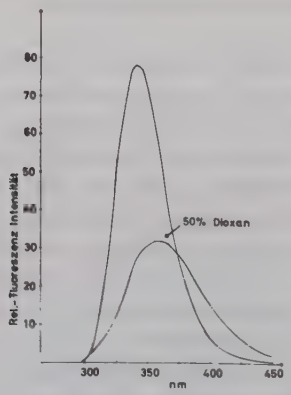


Abb.27: Emissions-Spektrum der RNase T_1 in H_2O und bei Zusatz von 50% Dioxan

Abbildung 28 zeigt die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz-Intensität von Tryptophan bei 360 nm vom freien Enzym und in Gegenwart von 3'-Gp_x. Die starke Abnahme im stärker al-

kalischen Gebiet entspricht der zunehmenden Deprotonierung der Chromophore. Der Zusatz von 3'-Gp löscht die Fluoreszenz-Intensität über den ganzen pH-Bereich beträchtlich. Dabei findet eine geringe Rotverschiebung des Emissionsmaximums um 2 nm statt. Aus der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz-Intensität im Bereich der größten Enzymaktivität erhält man pK-Werte von 7,2 und 4,0 für das freie Enzym, die sich bei Zusatz von 3'-Gp auf 4,5 und 7,7 verschieben.

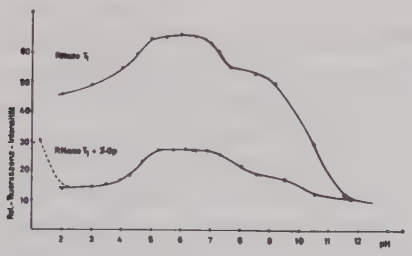


Abb.28: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz-Emission bei 360 nm des freien Enzyms und bei Zusatz von 3'-Gp

Läßt man den Enzym-Inhibitor-Komplex zwischen RNase T_1 und 3'-Gp länger im Sauren stehen, so nimmt durch die eingetretene Denaturierung des Proteins die Fluoreszenz-Intensität wieder zu (gestrichelter Verlauf in Abb.28).
Abbildung 29 zeigt die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz-Intensität der Tyrosine bei 295 nm vom freien Enzym und bei Zusatz von 3'-Gp. Im alkalischen Bereich sind die Verhältnisse analog zu Abbildung 28. Der Zusatz von 3'-Gp unterbindet den Wechsel der Fluoreszenz-Intensität bei pH 7,0 und pH 4,0. Stattdessen tritt eine kleine Stufe bei pH 6,5 auf in dem Bereich, wo 3'-Gp von der dianionischen in die monoanionische Form übergeht.

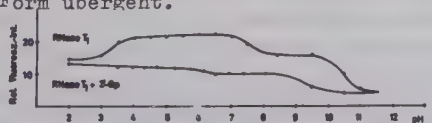


Abb.29: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz-Emission bei 295 nm des freien Enzyms und bei Zusatz von 3'-Gp

Bei Zusatz von 3'-Ap, Guanin und Guanosin nimmt die Fluoreszenz-Intensität von Tryptophan und Tyrosin analog zu 3'-Gp ab. Die Änderungen sind nicht so groß, da die Komplexbildung zwischen Enzym und Inhibitor bei diesen Substanzen schwächer ist. Bei Zusatz von 2'-5'-GpC wird die Fluoreszenz-Intensität des Tryptophans analog zum Guanin-Zusatz erniedrigt. Die Löschung der Tyrosin-Fluoreszenz bei 295 nm ist jedoch wesentlich größer. Die Abbildungen 30 und 31 zeigen die Ergebnisse.

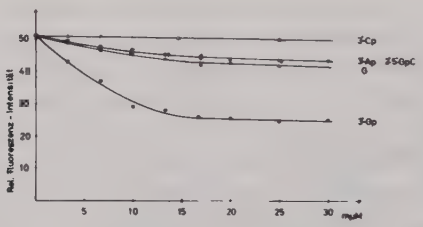


Abb.30: Senkung der Fluoreszenz-Intensität der RNase T_1 bei 360 nm durch Zusatz von Inhibitoren, e = 17,5 mμM

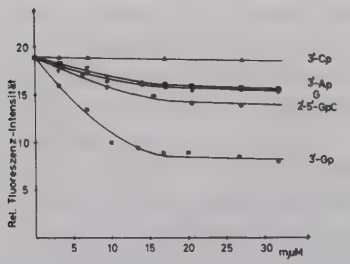


Abb.31: Senkung der Fluoreszenz-Intensität der RNase T_1 bei 295 nm durch Zusatz von Inhibitoren, e = 17,5 mμM

Bis zu einem Konzentrationsverhältnis von 1:1 zwischen Enzym und Inhibitor nimmt die Fluoreszenz-Intensität kontinuier-

lich ab, dann praktisch nicht mehr. Aus den so erhaltenen Daten ist es möglich, die K_i-Werte auszurechnen, indem man Gl.19,20 und 21 miteinander kombiniert.

$$\frac{(E-x)\cdot(I-x)}{x} = K_i \qquad \text{Gl.19}$$

$$\frac{(E-y)\cdot(I-y)}{y} = K_i \qquad \text{Gl.20}$$

$$\frac{\Delta Q_x}{\Delta Q_y} = \frac{[x]}{[y]} \qquad \text{Gl.21}$$

Für die Kombination von 3'-Gp mit der RNase T_1 bei pH 6,40 erhält man einen K_i-Wert von $8{,}2.10^{-6}$mol/l. Dies stimmt mit dem in Abschnitt C2 kinetisch bestimmtem K_i-Wert von $7{,}4.10^{-6}$mol/l gut überein. Bei Guanin ist die Übereinstimmung ebenfalls ganz gut. Der aus Abb.30 berechnete K_i-Wert beträgt $0{,}8.10^{-4}$mol/l. Der kinetisch bestimmte (sh.Abschnitt E) beträgt $1{,}2.10^{-4}$mol/l.

Das Emissions-Maximum des Tryptophans in Proteinen liegt meistens bei kürzeren Wellenlängen als das des freien Tryptophans in Wasser. Nach der Denaturierung von Proteinen kann sehr oft eine Verschiebung des Emissions-Maximums zu längeren Wellenlängen beobachtet werden (66), entsprechend dem Übergang von einer unpolaren zu einer polaren Umgebung (65). Diese Rotverschiebung in polaren Medien beruht auf einem Energieverlust des angeregten Zustandes durch eine Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel. Die Größe dieser Wechselwirkung hängt von der Polarität des Lösungsmittels und von dem Dipolmoment des angeregten Zustandes des Chromophors ab. Mit abnehmender Polarität des Lösungsmittels nimmt auch die Fluoreszenz-Intensität von Tyrosin und Tryptophan zu (67).

Die Abbildungen 32 und 33 zeigen die Abhängigkeit der Fluoreszenz-Intensität bei 360 nm und 295 nm von der Polarität des Lösungsmittels, ausgedrückt in Volumen-Prozent Dioxan-Zusatz bei pH 4,5 und pH 6,5. Nach 25% Dioxan-Zusatz verschiebt sich das Emissions-Maximum zu längeren Wellen bis zu 360 nm. Die Sprünge in den Kurven entsprechen den in Abschnitt C5 gefundenen Diskontinuitäten von k_{cat} bei Senkung des Dielektrikums. Im Gegensatz zu den an Modellsubstanzen

gefundenen Ergebnissen nimmt die Fluoreszenz-Intensität bei Dioxan-Zusatz erst ab, um nach 30% Dioxan-Zusatz sich erst normal zu verhalten, d.h. mit weiterer Polaritätssenkung nimmt die Intensität zu.

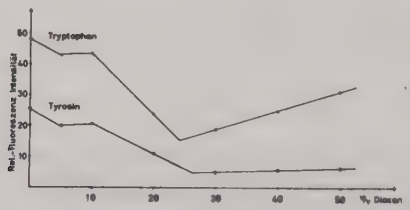


Abb.32: Abhängigkeit der Fluoreszenz-Emission der RNase T_1 bei 295 nm und 360 nm von der Polarität des Lösungsmittels (Die Emission des Tyrosins ist gegenüber der des Tryptophans mit einer 25fachen Verstärkung gemessen worden.) bei pH 6,5

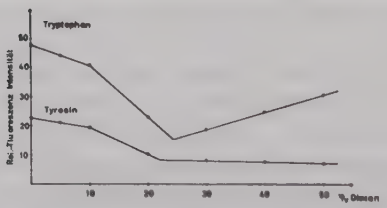
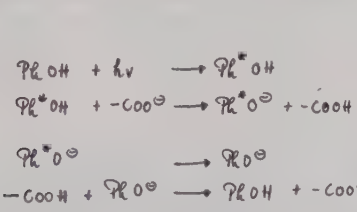


Abb.33: Abhängigkeit der Fluoreszenz-Emission der RNase T_1 bei 295 nm und 360 nm von der Polarität des Lösungsmittels (Die Emission des Tyrosins ist gegenüber der des Tryptophans mit einer 25fachen Verstärkung gemessen worden.) bei pH 4,5

Folgerungen

Tryptophan und Tyrosin haben eine Quantenausbeute von 21% bzw. 20% (68). Obwohl das Verhältnis Tyrosin zu Tryptophan

bei der RNase T_1 9:1 ist, verhält sich die Fluoreszenz-Intensität wie 1:70. Die starke Fluoreszenzlöschung der Tyrosine deutet darauf hin, daß die meisten Tyrosine Wasserstoffbrücken ausbilden. Sie kann durch strahlungslose Übergänge unter Einfluß von Nachbargruppen z.B. nach folgendem Mechanismus erklärt werden (63):



Statt der Carboxylat-Gruppen können auch andere Basen den gleichen Effekt verursachen. In Verbindung mit den Kernresonanz-Daten und der Analyse der Primärstruktur kann daraus gefolgert werden, daß die Tyrosine vorwiegend mit Carboxylaten Wasserstoffbrücken ausbilden. Daraus erklärt sich auch, daß bei abnehmender Lösungsmittel-Polarität die Fluoreszenz-Intensität der Tyrosine ebenfalls abnimmt, da die Wasserstoffbrücken stärker stabilisiert werden. Ein Teil der Tyrosine muß in der Umgebung des aktiven Zentrums sein, da durch die Bindung der 3'-Gp eine Senkung der Fluoreszenz-Intensität um einen Faktor 2 stattfindet. Der bei Dioxan-Zusatz zuerst eintretende Sprung ist auf eine Konformationsänderung zurückzuführen, die sich in Abbildung 12 in einem diskontinuierlichen Verhalten der kinetischen Parameter in Abhängigkeit vom Dielektrikum ausdrückt. Der anschließend auftretende Knickpunkt, nach dem die Fluoreszenz-Intensität zunimmt, zeigt an, daß sich oberhalb 50% Dioxan-Zusatz das Protein zu entfalten beginnt und seine Struktur verliert. Die Fluoreszenzlöschung des Tryptophans bei Zusatz von Inhibitoren kann zwei Ursachen haben. Das Tryptophan kann einmal einen π-Komplex mit dem Purin-Ring bilden, zum andern kann die Bindung des Inhibitors eine Konformationsänderung hervorrufen, die verursacht, daß das Tryptophan noch mehr in das Innere des Proteins gelangt und dann in eine Nachbarschaft von Gruppen gerät, die den strahlungslosen Übergang aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand begünstigen.

Die Existenz einer spezifischen Bindung macht die Ausbildung eines π-Komplexes unwahrscheinlich, zumal die bisherigen kinetischen und Kernresonanz-Daten schon auf eine solche induzierte Konformationsänderung schließen lassen und die Fluoreszenz-Intensitäten von Tyrosin und Tryptophan sich analog verhalten. Daß das Tryptophan im Innern des aktiven Zentrums ist, geht auch daraus hervor, daß bei abnehmender Lösungsmittel-Polarität die Fluoreszenz-Intensität abnimmt und die zu erwartende Rotverschiebung des Emissions-Maximums erst eintritt, wenn das Protein seine Struktur verliert.
Während für die eintretende Fluoreszenzlöschung durch eine Änderung der DK eine stärkere Fixierung des Tryptophans als Ursache anzunehmen ist, gilt dies für die pH-abhängige Abnahme der Fluoreszenz-Intensität im Bereich von pH 3-9 nicht, da sie hier nicht durch eine Änderung des Lösungsmittels, d.h. der Umgebung, sondern durch Konformationsänderungen des Proteins selbst hervorgerufen wird (62). Die Lebenszeit des Anregungszustandes beträgt 10^{-9}- 10^{-8}sec, so daß er in Wechselwirkung mit diffusionskontrollierten Prozessen treten kann. Solche Wechselwirkungen mit dem "backbone" des Proteins können die Fluoreszenz-Intensität erniedrigen und sind umso stärker, je weniger fixiert der betreffende Chromophor ist. Daraus erklärt sich die Abnahme der Fluoreszenz-Intensität bei pH 4,0 und pH 7,0. Durch die in diesen pH-Bereichen eintretenden Protonierungen bzw. Deprotonierungen brechen die das aktive Zentrum aufbauenden B-H···B-Systeme auf und das aktive Zentrum verliert seine Strukturierung. Daraus resultiert für das im aktiven Zentrum befindliche Tryptophan, daß es weniger fixiert ist, d.h. beweglicher wird. Damit nimmt seine Fluoreszenz-Intensität ab, da nun strahlungslose Übergänge durch Wechselwirkung mit den Nachbargruppen erleichtert sind.
Die relativ vermehrte Fluoreszenzlöschung der Tyrosine bei Zusatz von 2'-5'-GpC zeigt an, daß zwischen 5'-Base und dem aktiven Zentrum eine hydrophobe Wechselwirkung existiert. Daraus wird auch die Geschwindigkeitsabnahme innerhalb der 3'-Guanylsäure-Diester um einen Faktor 3,2 verständlich, die parallel zur Abnahme des aromatischen Charakters der 5'-Base läuft.

Die Ergebnisse der Fluoreszenz-Messungen bestätigen, daß die RNase T_1 eine pH-abhängige Konformation hat und daß das Substrat in der Umgebung des aktiven Zentrums eine Konformationsänderung induziert. Die bei den Kernresonanz-Messungen gefundenen Veränderungen der Signale der aromatischen Protonen von Tyrosin und Tryptophan stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit Änderungen des aktiven Zentrums und seiner Umgebung.

3. Ergebnisse der Differenz-Spektroskopie

Die Absorption der Chromophore ist stark abhängig von ihrer Umgebung(69). Durch die von Herskovits und Laskowski (70) entwickelte Methode der Differenz-Spektroskopie ist es möglich, Tyrosin- und Tryptophan-Reste im Protein zu lokalisieren (71,72). Durch Zusatz nicht-wässriger Lösungsmittel nutzt man den Effekt der Lösungsmittel-Perturbation aus. Das Hauptanwendungsgebiet bezieht sich auf die Absorptionsbanden von Tyrosin und Tryptophan im Spektralbereich von 260 - 300 nm. Die Analyse der spektralen Differenzen kann auf das Gebiet unter 250 nm ausgedehnt werden (73), wo neben Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin auch Histidin und Glutaminsäure Absorptionsbanden haben(74). Unter geeigneten Bedingungen ist es möglich, Änderungen, die Histidin und Glutaminsäure betreffen, spektral zu erfassen.
Die Differenz-Spektroskopie wurde angewendet, um die in Abschnitt C2 geforderte unterschiedliche Bindung von 2'-Gp und 3'-Gp zu bestätigen und den Nachweis zu erbringen, daß die spezifische Bindung des Substrats durch ein B-H···B-System aus Carboxylat- und Imidazolium-Ion (Histidin 2 der Kernresonanz-Messungen) durchgeführt wird.
Der Zusatz der Inhibitoren 2'-Gp und 3'-Gp ergibt ein unterschiedliches Differenzspektrum (Abb.34). Die pH-Abhängigkeit des Differenzspektrums von der RNase T_1 und 2'-Gp entspricht dem pK_i/pH-Profil (27). Ebenso entspricht die pH-Abhängigkeit des Differenz-Spektrums von der RNase T_1 und 3'-Gp dem pK_i/pH-Profil von 3'-Gp. Damit kann der in Abschnitt C2 gezogene Schluß über die unterschiedliche Bindung von 2'-Gp

und 3'-Gp bestätigt werden.

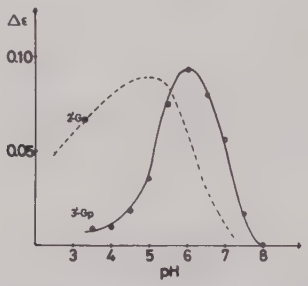


Abb.34: pH-Abhängigkeit des Differenzspektrums bei 290 nm von RNase T_1 und 2'-Gp bzw. 3'-Gp

Um über den Kurvenverlauf im Bereich von 235nm genaue Aussagen machen zu können, wurden Modellversuche unternommen, die zeigen sollten, welche spektralen Änderungen zu erwarten sind, wenn ein Imidazol mit einem Carboxylat-Ion in Wechselwirkung tritt. In dem System Eisessig-Imidazol findet man eine Zunahme der Absorption, wenn die Wechselwirkung zwischen Eisessig und Imidazol durch Zugabe von HCl gestört wird und eine Abnahme der Absorption, wenn zu einer Lösung von Imidazol in HCl Eisessig zugesetzt wird, d.h. eine stärkere Wechselwirkung zwischen Acetat und Imidazol erniedrigt die optische Dichte.
Die Meßbedingungen für das System RNase T_1/3'-Gp wurden so gewählt, daß das Verhältnis zwischen (E) und (EI) 5:1 war. Abbildung 35 zeigt die so gemessenen Differenzspektren im Bereich von 300 - 230 nm bei pH 4,0, 4,5 und 6,0.

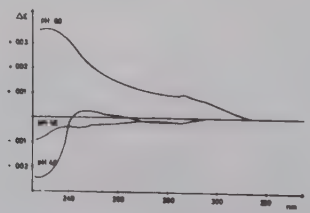


Abb.35: Differenzspektren zwischen RNase T_1 und 3'-Gp bei verschiedenen pH-Werten; (E):(EI) wie 5:1

Während bei pH 7,0 - pH 5,5 eine Zunahme der Absorption festzustellen ist, tritt ab pH 5,0 eine Abnahme auf. Die Ergebnisse der Fluoreszenz-Spektroskopie haben gezeigt, daß eine Abnahme der Lösungsmittel-Polarität die Wechselwirkungen zwischen Carboxylat-Ionen und Tyrosinen verstärkt. Wenn zwischen den Imidazolen und Carboxylat-Ionen eine Wechselwirkung besteht, dann sollte ebenfalls eine zunehmende Stabilisierung dieser Wasserstoffbrücken bei Senkung der Dielektrizitätskonstanten eintreten, d.h. bei Zusatz von Dioxan muß die Absorption abnehmen. Abbildung 36 zeigt die bei pH 7,0 und pH 4,5 aufgenommenen Differenzspektren bei 20% Dioxan-Zusatz. Bei beiden pH-Werten nimmt die Fluoreszenz ab, Das Differenzspektrum bei pH 4,5 entspricht dem im System RNase T_1/3'-Gp bei diesem pH-Wert gemessenen, während das bei pH 7,0 genau das entgegengesetzte Vorzeichen hat.

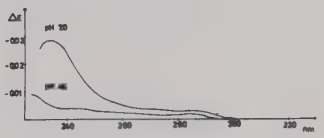
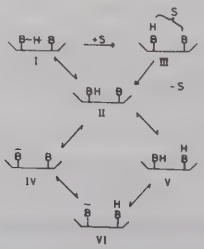


Abb.36: Differenzspektrum zwischen RNase T_1 und 3'-Gp bei 20%-Dioxan-Zusatz bei pH 4,5 und 7,0

Folgerungen

Untersucht man die Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor unter Bedingungen wie bei den Kernresonanz-Messungen (Enzym- und Inhibitorkonzentration 10^{-3}M), wo das Enzym praktisch vollständig im EI-Komplex vorliegt, so findet man keine Änderung des spektralen Verhaltens der spezifischen Bindungsseite. Wählt man aber eine Gleichgewichtslage wie bei den obigen Messungen und eine Methode wie die UV-Spektroskopie, die Relaxationszeiten bis zu 10^{-9}sec erfaßt, dann findet man eine spektrale Änderung. Daraus geht hervor, daß die ge-

fundenen Differenzspektren nicht der Bildung des EI-Komplexes entsprechen, sondern dadurch hervorgerufenen Sekundärprozessen.
Bei Zusatz von Anionen zur RNase A nimmt die Absorption im Bereich um 235 nm ab (75). Dies entspricht dem Ergebnis, daß die Absorption bei Zusatz von Eisessig zu einer Imidazolium-Lösung abnimmt. Eine stärkere Wechselwirkung zwischen Acetat-Ionen und Imidazol senkt die optische Dichte, eine schwächere Wechselwirkung erhöht sie. Der Zusatz von 3'-Gp bewirkt bei pH 7,0-5,5 eine Absorptionszunahme, d.h. an einem Imidazol wird eine Wasserstoffbrücke zu einem Carboxylat-Ion gelöst. Dieser Vorgang muß an der spezifischen Bindungsseite geschehen, da oberhalb von pH 6,5 das Imidazol der katalytischen Seite nicht Wasserstoffbrücken-gebunden ist (Histidin 3 der Kernresonanz-Messungen). Unterhalb von pH 5,0 tritt eine Absorptionsabnahme ein analog zum Zusatz von Dioxan, d.h. die Wechselwirkung zwischen Carboxylat und Imidazol wird hier stärker. Berücksichtigt man die bei den Messungen gewählte Gleichgewichtslage, dann muß das folgende Schema zugrunde gelegt werden, wobei B-H·····B die spezifische Bindungsseite symbolisieren soll und S 3'-Gp



Die Bindung von 3'-Gp an die spezifische Bindungsseite induziert eine Konformationsänderung, so daß der Übergang von I nach III nicht reversibel ist, sondern über II abläuft. Die relativ lange Lebenszeit von II erklärt die Zunahme der Absorption bei pH 7,0. Der Zusatz von Dioxan verschiebt das Gleichgewicht ganz auf die Seite von I, so daß eine Absorp-

tionsabnahme stattfindet. Bei pH 4,0 ruft der Zusatz von 3'-Gp ebenfalls eine Absorptionsabnahme hervor, bewirkt also eine vermehrte Bildung von I. Dies liegt daran, daß jetzt mit dem Gleichgewicht I⇌II das zwischen V, VI und II durch die eintretende Protonierung des Carboxylat-Ions (C-2-Signal von Histidin 2 verschiebt sich zu niedrigerem Feld) konkurriert. Die Anwesenheit der 3'-Gp sollte diese Gleichgewichte entsprechend der vermehrten Bildung von I verschieben.

Die gefundenen spektralen Änderungen im 235 nm-Bereich können nicht durch Effekte auf die Chromophore von Tyrosin und Tryptophan erklärt werden, da im 290 nm-Bereich keine analogen spektralen Änderungen auftreten. Die gefundene Parallelität zwischen pH-Profil des Differenzspektrums und pK_i/pH-Profil für den Zusatz von 3'-Gp bzw. 2'-Gp bestätigt die Schlußfolgerungen in Abschnitt C2 und die geforderte unterschiedliche Bindung von 2'-Gp und 3'-Gp durch die RNase T_1.

E. Einfluß von Modifizierern auf die RNase T_1-Reaktion

Aus den bisherigen Ergebnissen konnte geschlossen werden, daß die RNase T_1 mit dem Substrat an drei Stellen mit Hilfe von Säuren bzw. Basen (Carboxylat,Imidazol) in Wechselwirkung tritt:1. an der Carbamid-Struktur der Base,2. an der C-2'-OH-Gruppe, 3. an der P-O-R-Gruppierung. Die stattfindende Mehrstufenreaktion ist in der Lage zu alternieren, d.h. die Reihenfolge der Mikroschritte und der geschwindigkeitsbestimmenden Stufe kann wechseln. Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob die spezifische Bindungsseite und die katalytische Seite unabhängig voneinander sind oder ob voneinander abhängige Wechselwirkungen stattfinden, auf denen die gefundene Konformationslabilität fußen könnte. Erste Anhaltspunkte haben die Untersuchungen der Strukturelemente der RNase T_1 in Abschnitt D ergeben. Um diese Fragen zu klären, wurden zur Spaltung von GpC und GpA bei pH 7,0 eine Reihe von Modifizierern zugesetzt und die pH-Abhängigkeit der modifizierten Katalyse mit einer repräsentativen Auswahl untersucht.

1. Theorie der Hemmung für den "one enzyme-one substrate"-Fall

Im allgemeinen folgt eine "one enzyme-one substrate"-Reaktion einer linearen Beziehung zwischen 1/v und 1/s. Allgemein läßt sich dies durch Gl.22 ausdrücken.

$$\frac{1}{v} = a + b\cdot[S]^{-1} \qquad \text{Gl.22}$$

Dieser Beziehung folgen auch alle Gleichungen, die zur quantitativen Behandlung der Hemmung einer Enzym-Katalyse abgeleitet worden sind(76). Hierbei legt man folgende Schemata zugrunde:

$$\begin{aligned} &E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P \\ &E + I \rightleftharpoons EI \end{aligned} \qquad (1)$$

$$\begin{aligned} &E + I \rightleftharpoons EI \searrow \\ &E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow EIS \rightarrow E + P + I \\ &\qquad\qquad\quad \searrow E + P \end{aligned} \qquad (2)$$

Der kompetitiven Hemmung nach Schema 1, wo I ein "dead end"-Inhibitor ist, entspricht Gl.23:

$$\frac{1}{v} = \frac{\chi_m}{k_{+2} \cdot e} \left(1 + \frac{i}{\chi_i}\right) \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{k_{+2} \cdot e} \qquad \text{Gl.23}$$

Der nicht kompetitiven Hemmung nach Schema 2 entspricht Gl.24:

$$\frac{1}{v} = \frac{\chi_m}{k_{+2} \cdot e} \left(1 + \frac{i}{\chi_i}\right) \cdot \frac{1}{s} + \frac{1 + \frac{i}{\chi_i}}{k_{+2} \cdot e} \qquad \text{Gl.24}$$

Ferner kann noch bei einer Mehrstufenreaktion noch ein Mischtyp der Hemmung auftreten, dem Gl.25 entspricht:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{\chi_m}{s} + \frac{i}{\chi_i}\left(\frac{\chi_m}{s'} + \frac{\chi_m}{\chi'_m}\right)}{k_{+2} \cdot e} \qquad \text{Gl.25}$$

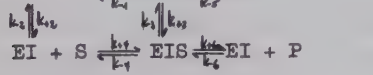
Bei der kompetitiven Hemmung werden die K_m-Werte größer, bei der nicht kompetitiven Hemmung die k_{+2}-Werte kleiner und bei der unkompetitiven Hemmung (Gl.25) ändern sich k_{+2}- und K_m-Werte. Alle Ableitungen gehen davon aus, daß das Enzym von vornherein voll aktiv ist und kein Gleichgewicht zwischen E_i und E_a besteht. Berücksichtigt man dies z.B. bei Schema 2, so erhält man:

(3)

Schema 3 entspricht Gl.26:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{i}{\chi_i}}{k_{+2} \cdot e} + \frac{\chi_m}{k_{+2} \cdot e} \left(1 + \frac{1}{\chi} + \frac{i}{\chi_i}\right) \cdot \frac{1}{s} \qquad \text{Gl.26}$$

Daraus ist zu ersehen, daß wiederum eine lineare Beziehung zwischen 1/v und 1/s resultiert. Das gleiche ist der Fall, wenn man die Existenz eines Gleichgewichtes zwischen E_i und E_a bei der kompetitiven und unkompetitiven Hemmung berücksichtigt. Eine weitere Möglichkeit ist, daß auch EIS zur Produktbildung befähigt ist.



(4)

Schema 4 entsprechen Gl.27 - 31.(77).

$$v = \frac{k_{+6} \cdot \left(1 + \frac{k_{+6}\,(EIS)}{k_{+5}\,(ES)}\right)}{1 + \frac{(E)}{(ES)} + \frac{(EI)}{(ES)} + \frac{(EIS)}{(ES)}}$$

$$E = k_{+1} k_{+3} k_{+4} \left(1 + \frac{k_{+5}}{k_{+4}}\right) \cdot \left[S + \frac{k_{+2}}{k_{+1}} \left\{\frac{1 + k_{+6}/k_{-4}}{1 + k_{+5}/k_{-1}}\right\} \cdot I + \frac{k_{-2}}{k_{+3} k_{-4}} \left(k_{-3} + k_{-4} + k_{-6}\right)\right]$$

$$ES = k_{+1} k_{+3} k_{+4} \cdot S \left[S + \frac{k_{+2}}{k_{+1}} \cdot I + \frac{k_{-2}}{k_{-3} k_{+4}} \cdot \left(k_{-3} + k_{-4} + k_{+6}\right)\right]$$

$$EI = k_{+1} k_{+3} k_{-4} \left(1 + \frac{k_{+6}}{k_{-4}}\right) \cdot I \left[S + \frac{k_{+2}}{k_{+1}} \cdot I + \frac{k_{-2}}{k_{-3} k_{+4}} \left\{\frac{1 + k_{+5}/k_{-1}}{1 + k_{+6}/k_{-4}}\right\} \left(k_{-3} + k_{-4} + k_{+6}\right)\right]$$

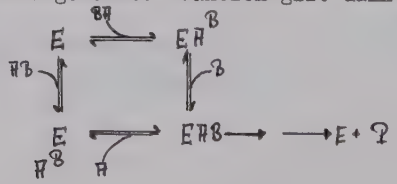
$$EIS = k_{+1} k_{+3} k_{+4} \cdot S \cdot I \left[S + \frac{k_{+2}}{k_{+1}} \cdot I + \frac{k_{-2}}{k_{-3} k_{+4}} \left(k_{-3} + k_{-4} + \frac{k_{-4}\, k_{+5}}{k_{-1}}\right)\right]$$

2. Auftreten von Sigmoidität im "one enzyme-one substrate"-Fall

Die Verhältnisse in Abschnitt E1 ändern sich grundlegend, wenn man die Möglichkeit einer Alternativ-Reaktion in Betracht zieht, die einen Übergang zum "one enzyme-two substrate"-Fall darstellt. Die allgemeine Gleichung 22 muß dann erweitert werden zu Gl.32 (78).

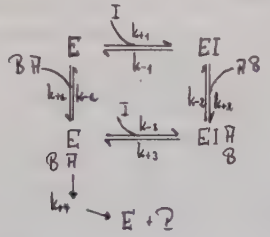
$$\frac{1}{\hat{v}} = a + b \cdot [S]^{-1} + c \cdot [S]^{-2} \qquad \text{Gl.32}$$

Für die ungehemmte Reaktion gilt dann Schema 5 :



(5)

A symbolisiert die spezifische Bindungsseite des Substrats und B die katalytische Seite.
Rechnet man dieses Schema durch, dann erhält man lineare Lineweaver-Burk plots, d.h. die Parameter a und b in Gl.32 determinieren das Verhältnis zwischen v und s. Wird ein Modifizierer zugesetzt, dann ist dies nicht mehr der Fall und es kann zu Hemmungen kommen, in denen der Parameter c mitbestimmend wird, d.h. die Lineweaver-Burk plots sind konkav und die v/s-Beziehung ergibt eine Sigmoid-Kurve. Einen vereinfachten Fall stellt Schema 6 dar.



(6)

Für diesen Fall ist von mir Gl.32 erweitert worden zu Gl.33

$$\frac{1}{\hat{v}} = a + b\cdot[I] + c\cdot\frac{[I]}{[HB]} + \frac{d}{[HB]} + e\cdot\frac{[I]}{[HB]^2} + \frac{f}{[HB]^2} \quad \text{Gl.33}$$

Hieraus ist ersichtlich, daß die Existenz zweier unabhängiger Seiten im aktiven Zentrum eines "one substrate"-Enzyms sigmoide Beziehungen zwischen Geschwindigkeit und Substrat-Konzentration bedingen kann. Die analytisch exakte Gleichung lautet unter Verwendung der S- und P-Terme nach Hearon et al.(79):

$$\frac{1}{\hat{v}} = S_4\cdot\left(1+\frac{1}{P_2}\right) + f_2 S_{12} + f_3\left(S_{33} + S_{23} + \frac{S_{43}}{P_1}\right) + S_{14} \quad \text{Gl.34}$$

$$f_2 = \frac{S'_{23}}{S''_{23} + S_{41}\cdot[HB]} \qquad f_3 = 1 - f_2$$

Die S- und P-Terme vereinigen Geschwindigkeitskonstanten und Substrat-Konzentrations-Terme. Die f-Terme repräsentieren die Geschwindigkeitsfraktionen der Reaktionswege von E über EI und EIAB zu EAB bzw. von E zu EAB. Gl.34 läßt sich ausführlich schreiben als Gl.35:

$$\frac{1}{\hat{v}} = \frac{1}{k_{+4}} \cdot \left(1 + \frac{k_{-a}}{k_{+a}[AB]}\right) + f_a \cdot \frac{1}{k_{+a}[AB]} + f_s \left(\frac{1}{k_{+3}} + \frac{1}{k_{+2} \cdot [AB]}\right.$$

$$\left. + \frac{k_{-2}}{k_{+2}[AB]k_{+3}} + \frac{k_{+1} \cdot [I]}{k_{-1} k_{+2} [AB]} + \frac{k_{+1} \cdot [I]}{k_{-1} k_{+2}[AB]k_{+3}}\right) + \frac{[I] \cdot k_{+1}}{k_{-1} \cdot k_{+4}} \qquad \text{Gl.35}$$

$$f_a = \frac{\frac{1}{k_{+a}} + \frac{k_{-2}}{k_{+2} k_{+3}}}{\frac{1}{k_{+2}} + \frac{k_{-2}}{k_{+2} k_{+3}} + \frac{[AB]}{k_{-1}}}$$

In diesem Fall erhält man zwischen $1/\hat{v}$ und (I) eine lineare Beziehung, während zwischen $1/\hat{v}$ und 1/AB sich eine nicht-lineare Beziehung ergibt. Für das obige Schema 6 sind das zwei entscheidende Kriterien, die bei den Untersuchungen zur Hemmung Bedeutung erlangen werden.
Zwei Bedingungen sind notwendig, damit sich Gl.35 zu Gl.22 bzw. Gl.24 reduziert, d.h. unter entsprechenden Bedingungen eine nicht kompetitive Hemmung auftritt. Der f_a-Term darf nicht groß und bestimmend sein und der (AB) enthaltende Term im Nenner von f_a darf nicht bestimmend werden. Diese Bedingungen werden erfüllt, wenn

$$\frac{1}{k_{+a}} \ll \left(\frac{1}{k_{+2}} + \frac{k_{-2}}{k_{+2} k_{+3}}\right) \cdot \left(1 + \frac{k_{+1} \cdot [I]}{k_{-1} \; k_{+4}}\right) \qquad \text{Gl.36}$$

und $$\frac{[AB]}{k_{-1}} \ll \frac{1}{k_{+2}} + \frac{k_{-2}}{k_{+3} k_{+3}} \qquad \text{Gl.37}$$

ist. Daraus resultiert dann eine lineare Beziehung, wie sie für die unmodifizierte Reaktion bzw. die klassische Hemmung gefunden wird. Es wird sich zeigen, daß man bei geeigneter Wahl von (I) eine nicht-lineare v/s-Kurve in eine lineare überführen kann.
In Anlehnung an die bei Eigen und Hammes (80) angeführten Geschwindigkeitskonstanten ist es möglich, für die einzelnen Schritte die Größenordnungen der Geschwindigkeitskonstanten anzugeben, bei denen eine Sigmoid-Kurve im v/s-Diagramm auftaucht, wenn die Konzentration von (I) 10^{-4} mol/l ist und die Substrat-Konzentration variiert wird. In Tabelle 6 sind die entsprechenden Werte wiedergegeben.

Tabelle 6

Geschwindigkeitskonstanten für Gl.35 und Schema 6

Geschw.Konst. 1.Ordn.	sec^{-1}	Geschw.Konst. 2.Ordn.	$M^{-1}sec^{-1}$
k_{-1}	10^4	k_{+1}	10^7
k_{-2}	10^3	k_{+2}	10^7
k_{+3}	10^3	k_{+a}	10^6
k_{+4}	10^2		
k_{-a}	1		

Im nächsten Abschnitt wird gezeigt werden, daß die hieraus theoretisch errechnete v/s-Kurve mit den experimentell gemessenen übereinstimmt.
Weiterhin muß noch berücksichtigt werden, daß das Enzym in einem Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Form vorliegen kann. Wenn der Inhibitor mit dem Enzym vorzugsweise einen Komplex in der inaktiven Form bildet und gleichzeitig der Zerfall des aktivierten ES-Komplexes schneller ist als die Nachbildung der aktiven Enzym-Species, kommt es ebenfalls zu einem sigmoidalen Kurvenverlauf im v/s-Diagramm. Dies ist das Phänomen der Substrataktivierung. Es läßt sich von Schema 6 insofern unterscheiden, daß man im 1/v/(I)-Diagramm eine Parallele zur (I)-Achse finden muß, da unter den bei den kinetischen Messungen eingehaltenen steady-state Bedingungen eine Variation von (I) kaum die entsprechenden Gleichgewichte beeinflußt. Unter bestimmten Bedingungen kann hierbei das Phänomen des "initial burst" beobachtet werden.

3. Modifizierung der RNase T_1-Reaktion bei pH 7,0

Es ist bekannt, daß die Nucleotide U, A, G und C die RNase T_1-Reaktion hemmen (24). Da jedoch nicht untersucht worden ist, welche Art der Hemmung dabei auftritt und ob die Nucleoside bzw. Nucleobasen auch hemmen, wurde systematisch der Einfluß aller 4 Basen, der entsprechenden Nucleoside, der Nucleotid-Isomeren, entsprechender Dinucleosid-Phosphate, von Phosphat, Pyrophosphat und analoger Derivate untersucht. Nach den ge-

fundenen Hemmungen geordnet, zeigen Tabelle 7, 8 und 9 die Ergebnisse.

Tabelle 7

Kompetitve Hemmung der GpC-Spaltung bei pH 7,0

Inhibitor	conc.(mol/l)	K_i(mol/l)
C	$0{,}95 \cdot 10^{-4}$	$4{,}52 \cdot 10^{-4}$
3'-Cp	$0{,}94 \cdot 10^{-4}$	$6{,}80 \cdot 10^{-4}$
D-Ribose	$1{,}14 \cdot 10^{-4}$	$3{,}80 \cdot 10^{-4}$
3'-Cp-me	$0{,}72 \cdot 10^{-4}$	$2{,}82 \cdot 10^{-4}$
Guanin	$0{,}70 \cdot 10^{-4}$	$1{,}17 \cdot 10^{-4}$
dG	$0{,}93 \cdot 10^{-4}$	$1{,}46 \cdot 10^{-4}$
Isoprop.-G	$0{,}55 \cdot 10^{-4}$	$1{,}30 \cdot 10^{-4}$
N-7-me-G	$0{,}98 \cdot 10^{-4}$	$2{,}45 \cdot 10^{-4}$
I	$0{,}80 \cdot 10^{-4}$	$2{,}50 \cdot 10^{-4}$
G-2':3'-P	$0{,}80 \cdot 10^{-4}$	$1{,}04 \cdot 10^{-4}$
6-ß-oxyamino-äthylpurin	$1{,}02 \cdot 10^{-4}$	$9{,}10 \cdot 10^{-4}$
3'-Gp	$0{,}05 \cdot 10^{-4}$	$2{,}25 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 8

Nicht kompetitive Hemmungen der GpC-Spaltung bei pH 7,0

Inhibitor	conc.(mol/l)	K_i(mol/l)
2'-Cp	$0{,}90 \cdot 10^{-4}$	$6{,}93 \cdot 10^{-4}$
2'-Up	$1{,}12 \cdot 10^{-4}$	$7{,}30 \cdot 10^{-4}$
2'-Ap	$0{,}82 \cdot 10^{-4}$	$2{,}74 \cdot 10^{-4}$
dA	$0{,}89 \cdot 10^{-4}$	$2{,}02 \cdot 10^{-4}$

Mit Ausnahme von Guanosin, 8-OH-Guanosin und 5'-GDP hemmen alle eingesetzten Guanin-Derivate kompetitiv. 3'-Gp hemmt um einen Faktor 20 stärker als Guanin. Die anderen Derivate hemmen in zu Guanin vergleichbarer Stärke. Die K_i-Werte wurden nach Gl.23 ausgerechnet. Die 2'-Nucleotide -außer 2'-Gp natürlich- und dA hemmen nicht kompetitiv. Die nach Gl.24 ausgerechneten K_i-Werte liegen ebenfalls in der Größenordnung von 10^{-4}. In Tabelle 9 sind alle zugesetzten Modifizierer wiedergegeben, die eine sigmoide Beziehung zwischen v und s ergeben.

Tabelle 9

Hemmungen des Sigmoid-Typs der GpC-Spaltung bei pH 7,0

Inhibitor	conc.(mol/l)
Uracil	$1{,}00\ 10^{-4}$
Uridin	$1{,}00\ 10^{-4}$
3'-Up	$1{,}16\ 10^{-4}$
Barbiturs.	$0{,}50\ 10^{-4}$
Adenin	$1{,}00\ 10^{-4}$
Adenosin	$0{,}82\ 10^{-4}$
3'-Ap	$0{,}82\ 10^{-4}$
Pyrophosphat	$1.00\ 10^{-4}$
Citronens.	$1.00\ 10^{-4}$
5'-GDP	$0{,}70\ 10^{-4}$
Cu^{2+}	$1{,}00\ 10^{-7}$
Cytosin	$1{,}00\ 10^{-4}$
C-2':3'-P	$1{,}17\ 10^{-4}$
CpC	$0{,}98\ 10^{-4}$
A-2':3'-P	$0{,}77\ 10^{-4}$
ApA	$0{,}50\ 10^{-4}$
Na, ADP	$0{,}89\ 10^{-4}$
Phosphat	$1{,}00\ 10^{-4}$
Guanosin	$0{,}79\ 10^{-4}$
8-OH-G	$0{,}46\ 10^{-4}$

Die bei den Hemmungen in Tabelle 9 erhaltenen Lineweaver-Burk plots schneiden rechts vom Koordinatenursprung die 1/s-Achse oder aber laufen genau durch den Koordinatenursprung. Als Beispiel zeigt Abbildung 37 die erhaltenen Lineweaver-Burk plots bei Zusatz von Cytosin, CpC und Phosphat. Der tatsächliche Verlauf ist gestrichelt weitergeführt, da negative Geschwindigkeitskonstanten, die die durchgezogenen Geraden ergeben würden, nicht real sind. Daraus geht hervor, daß die aus der Michaelis-Menten-Kinetik folgende Beziehung gemäß Gl.22 hier nicht anwendbar ist. Trägt man entsprechend Gl.32 gegen $1/s^2$ auf, so ergibt sich, wie als Beispiel für den Zusatz von CpC gezeigt, der Kurvenverlauf von Abbildung 38, aus dem nunmehr Geschwindigkeitskonstanten ausgerechnet wer-

den können. Nach Gl.35 ist dann der Abschnitt auf der $1/\hat{v}$-Achse gleich $(1/k_{+4} + 1/k_{+3} + (I)k_{+1}/k_{-1}k_{+4})$. Dem Abschnitt auf der $1/s^2$-Achse entspricht ein noch wesentlich komplexerer Ausdruck. Dies zeigt, daß eine Angabe von K_i-Werten durch eine Ermittlung auf graphischem Wege nicht möglich ist. Deshalb sind in Tabelle 9 keine K_i-Werte angegeben.

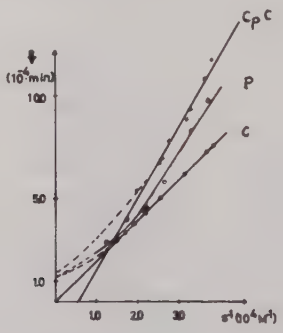


Abb.37: Lineweaver-Burk plots der GpC-Spaltung durch RNase T_1 bei Zusatz von Cytosin, CpC und Phosphat bei pH 7,0

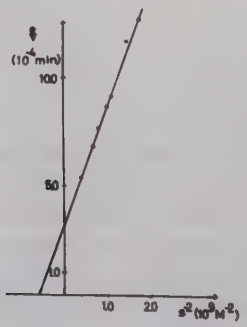


Abb.38: doppelt reziproke Auftragung der Geschwindigkeit gegen die quadratische Substrat-Konzentration für die GpC-Spaltung durch RNase T_1 bei Zusatz von CpC bei pH 7,0

Es ist jedoch möglich, auf Grund der in Abschnitt E2 ent-

wickelten Vorstellungen unter Zuhilfenahme eines Computers die nach Gl.35 berechneten $1/\hat{v}/1/s$-Kurven mit den experimentellen zu vergleichen. Abbildung 39 und Tabelle10 zeigt das mit Hilfe des "curve fitting"-Verfahrens für den Zusatz von Phosphat erhaltene Ergebnis.

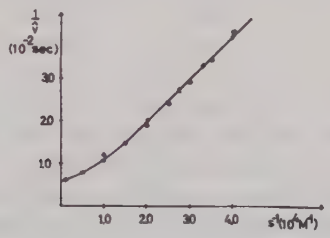


Abb.39: Vergleich der nach Gl.35 berechneten Kurve mit der experimentell gemessenen für den Zusatz von Phosphat zur GpC-Spaltung durch RNase T_1 bei pH 7,0; x - berechnete, o - gemessene Werte

Tabelle 10

Eingesetzte Geschwindigkeitskonstanten für die Berechnung des Kurvenverlaufs nach Gl.35 in Abbildung 39

Geschw.Konst. 1.Ordn.	sec^{-1}	Geschw.Konst. 2.Ordn.	$M^{-1}sec^{-1}$
k_{-1}	$2,3\cdot10^4$	k_{+1}	$7,4\cdot10^5$
k_{-2}	10^3	k_{+2}	$6,8\cdot10^7$
k_{+3}	10^3	k_{+a}	$5,2\cdot10^5$
k_{+4}	10^2		
k_{-a}	1		

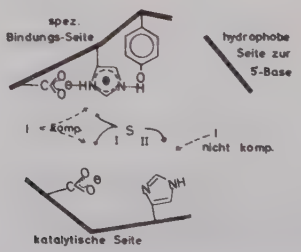
(I) = $1,0\cdot10^{-4}$mol/l

Mißt man die GpC-Spaltung bei Zusatz einer 1000fach höheren Phosphat-Konzentration, so findet man, wie aus den theoretischen Überlegungen in Abschnitt E2 zu erwarten ist, den Typ der nicht kompetitiven Hemmung. Mit Gl.24 ergibt sich dann ein K_i-Wert von $2,7\cdot10^{-2}$mol/l, der mit dem nach Gl.35 (sh.Tabelle 10) berechneten gut übereinstimmt.($3,1\cdot10^{-2}$mol/l).

Zur Spaltung von GpA durch die RNase T_1 bei pH 7,0 wurden als Modifizierer bzw. als Inhibitoren Guanin, Guanosin, Cytosin, D-Ribose, Phosphat, 3'-Gp und Cu^{2+} zugesetzt. Die Ergebnisse entsprechen denen bei der GpC-Spaltung, d.h. die erhaltenen sigmoiden Beziehungen zwischen v und s sind kein nur für die Spaltung von GpC geltendes Einzelphänomen.

Folgerungen

Das Auftreten von kompetitiver und nicht kompetitiver Hemmung deutet daraufhin, daß die Katalyse in zwei Hauptschritten abläuft. Inhibitoren, die den ersten Schritt stören, geben eine kompetitive Hemmung, solche, die den 2.Schritt stören, eine nicht kompetitive Hemmung, wenn dabei die Reihenfolge der einzelnen Schritte nicht verändert wird. Modifizierer, die eine Sigmoid-Kurve hervorrufen, sollten, indem sie eine Umkehr der Reihenfolge der Schritte bewirken, entsprechend Schema 6 die Katalyse beeinflussen. Dies wird vor allem dadurch angezeigt, daß die experimentell gemessenen und die nach Gl.35 berechneten Werte gut übereinstimmen. Eine Ordnung der eingesetzten Modifizierer nach Strukturmerkmalen läßt folgende Schlüsse zu, die anhand von Schema 7 erklärt werden können:



Schema7: schematische Darstellung der Vorgänge im aktiven Zentrum der RNase T_1 zur Erklärung der gefundenen Hemmungen

Den nicht kompetitiven Inhibitoren ist gemeinsam, daß sie

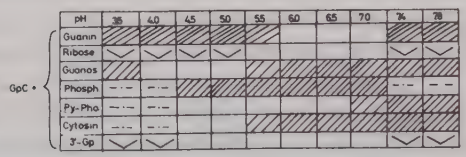
in 3'-Stellung eine OH-Gruppe haben und von einer hydrophoben Bindungsseite fixiert werden können. Durch Wechselwirkung mit dem Imidazol an der katalytischen Seite beeinflussen sie deshalb Stufe II der Katalyse, d.h. den Übergang von ES über ES* in E und P. Daraus folgt das Auftreten der nicht kompetitiven Hemmung. Den kompetitiven Inhibitoren ist gemeinsam, daß sie mit einer der beiden Wechselwirkungen in Stufe I konkurrieren können. Sie haben als Strukturmerkmal entweder die spezifisch gebundene Carbamid-Gruppe oder aber eine freie 2'-OH-Gruppe. Daraus resultiert die kompetitive Hemmung. 3'-Gp hemmt ebenfalls kompetitiv, da es an allen Seiten das aktive Zentrum blockiert ohne eine Ausweichreaktion zuzulassen. Entsprechend dem Übergang von ein- zu zweizähnigen Liganden in der Komplexchemie ist die Hemmung 20mal größer, d.h. der K_i-Wert ist um einen Faktor 20 kleiner. Die Inhibitoren, die eine sigmoide Beziehung zwischen v und s hervorrufen, gehen eine Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum ein, die bewirkt, daß Stufe I und Stufe II sich umkehren und das Substrat den aktivierten Komplex vorwiegend über II nach I bildet. Dies kann geschehen durch Wechselwirkung des Inhibitors mit der spezifischen Bindungsseite und der Carboxylat-Gruppe der katalytischen Seite (z.B. G, 8-OH-G, 5'-GDP, U, 3'-Up, Barbitursäure u.ä.) oder durch Wechselwirkung des Inhibitors mit der hydrophoben Bindungsseite und der spezifischen Bindungsseite oder der Carboxylat-Gruppe der katalytischen Seite (z.B. A, 3'-Ap, 3'-Cp, CpC u.ä.).
Daraus folgt, daß die RNase T_1-Reaktion entsprechend Schema 5 in einer Alternativ-Reaktion ablaufen kann. Es ergibt sich deshalb als Konsequenz, daß kompetitive bzw. nicht kompetitive Inhibitoren bei bestimmten pH-Werten sigmoide Relationen hervorrufen und umgekehrt, wenn die Reihenfolge von Stufe I und II pH-abhängig ist. Weiterhin zeigen diese Daten unter Berücksichtigung der unter D wiedergegebenen Resultate, daß bei pH 7,0 neben dem zweifach gekoppelten B-H···B···H-B-System an der spezifischen Bindungsseite an der katalytischen Seite die unmittelbar in die Katalyse eingreifenden Gruppen nicht miteinander gekoppelt sind.

4. pH-Abhängigkeit der Hemmung der GpC-Spaltung durch RNase T_1

Da über die pH-Abhängigkeit der Hemmung der RNase T_1-Reaktion durch Zusatz von 3'-Gp und 2'-Gp in Abschnitt C2 schon berichtet worden ist, sollen hier nur die bei Zusatz von Guanin, Guanosin, D-Ribose, Cytosin, Phosphat und Pyrophosphat erhaltenen Daten qiedergegeben werden. Zusammen mit der Hemmung durch 3'-Gp zeigt Tabelle 11 die Ergebnisse.

Tabelle 11

pH-Abhängigkeit von modifizierten RNase T_1-Reaktionen



Substrataktivierung, Modifiziereraktivierung,
keine Hemmung kompetitive Hemmung

Daraus ist ersichtlich, daß alle der GpC-Spaltung zugesetzten Inhibitoren in bestimmten pH-Bereichen sigmoide Kurven im v/s-Diagramm ergeben, die einer Aktivierung durch das Substrat oder einer Aktivierung durch den Inhibitor zuzuordnen sind. Deshalb ist es nicht möglich, aus diesen Daten pK-Werte zu erhalten für einzelne am Inhibitor angreifende funktionelle Gruppen des aktiven Zentrums der RNase T_1, da die entsprechende quantitative Behandlung (76) auf Vorstellungen beruht, die das Auftreten sigmoider Kurven nicht erklären können.

Um zu prüfen, in welchen pH-Bereichen die gefundenen Substrataktivierungen mit Gl.35 erfaßt werden können, wurde bei pH 4,5 und pH 6,5 bei konstanter Substratkonzentration die Abhängigkeit von 1/v gegen (I) untersucht. Die Abbildungen 40 und 41 zeigen die Ergebnisse.

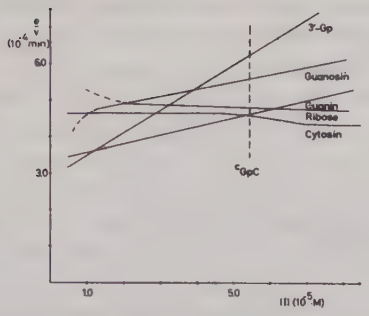


Abb.40: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der RNase T_1-Reaktion von der Inhibitorkonzentration bei pH 4,5

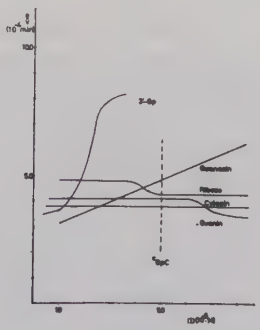


Abb.41: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der RNase T_1-Reaktion von der Inhibitorkonzentration bei pH 6,5

Hieraus ist ersichtlich, daß die nach Gl.35 zu fordernde lineare Beziehung zwischen $1/\Phi$ und (I) bei Zusatz von Guanin und Guanosin besteht. Der Zusatz von D-Ribose und Cytosin ergibt nicht eine solche lineare Beziehung. 3'-Gp ergibt entsprechend der gefundenen kompetitiven Hemmung bei pH 4,5 eine lineare Beziehung. Bei pH 6,5 findet sich das Phänomen des"initial burst", d.h. bis zu einer 3'-Gp-Konzentration von $7{,}0 \cdot 10^{-6}$mol/l findet man eine normale Reaktionskurve (obere Kurve in Abb.42). Bei höheren Konzentrationen im Be-

reich von 10^{-5}mol/l findet zuerst noch eine Reaktion statt, die schnell zum Erliegen kommt (untere Kurve in Abb.42).Bei noch höherer 3'-Gp-Konzentration erhält man dann im 1/v/(I)-Diagramm eine Parallele zur (I)-Achse.

Abb.42: Auftreten des "initial burst" bei der Hemmung der RNase T_1-Reaktion durch Zusatz von 3'-Gp

Folgerungen

In den sauren und alkalischen Grenzbereichen der Aktivitätskurve liegt ein Gleichgewicht zwischen inaktiven und aktiven Isomeren des Enzyms vor (sh. pH-Abhängigkeit, Fluorezenz-Messungen, Ergebnisse der Differenz-Spektroskopie). Durch Zusatz von Inhibitoren werden diese Gleichgewichte verschoben zugunsten der aktiven Species, deren Rückumwandlung in die inaktive Species dann langsamer ist als die Herandiffusion des Substratmoleküls. Dem entsprechen die durch Zusatz von Guanin, Guanosin und 3'-Gp in diesen Bereichen gefundenen Aktivierungen. Da bei Zusatz von Phosphat dieses Phänomen nicht auftaucht, kann in Verbindung mit den Ergebnissen der Kernresonanz-Spektroskopie für Histidin 2 geschlossen werden, daß es sich hier vornehmlich um eine Stabilisierung der spezifischen Bindungsseite handelt. Im Alkalischen bleibt das an das Tyrosin gebundene Imidazol vermehrt beim Carboxylat-Ion und im Sauren wird die Wasserstoffbrücke zwischen Carboxylat- und Imidazolium-Ion begünstigt.
Bei einem Vergleich von Kalottenmodellen von 3'-Gp und GpC ist ersichtlich, daß die Phosphat-Gruppe in 3'-Gp nicht die gleiche räumliche Lage hat wie in GpC, wenn dieses völlig "gestackt" vorliegt. Daraus ist zu folgern, daß die Bindung

von 3'-Gp an die RNase T_1 nicht exakt die gleiche ist wie die von GpC, wenn die das aktive Zentrum bildenden Aminosäuren nicht völlig fixiert sind. Dem entspricht, daß man bei pH 6,5 einen "initial burst" findet, nicht aber bei pH 4,5. Das Auftreten des "initial burst" besagt, daß durch die Bindung des Inhibitors an das Enzym eine Umwandlung der Konformation in eine inaktive Form stattfindet, deren Rückumwandlung in die aktive Form sehr langsam ist. Bei 3'-Gp-Konzentrationen, die höher als die Substratkonzentration sind, findet sie kaum noch statt, so daß die Hemmung durch 3'-Gp einen Grenzwert erreicht. Die durch den "initial burst" angezeigte Konformationsänderung kann folgendermaßen erklärt werden: Die im Vergleich zu den Dinucleosid-Phosphaten etwas andere räumliche Lage der Phosphat-Gruppe bedingt, daß das das Phosphat bindende Imidazolium-Ion von der Carboxylat-Gruppe, die die 2'-OH-Gruppe aktiviert, entfernt wird, so daß bei der Abdissoziation der 3'-Gp das Imidazolium- zu einem andern Carboxylat-Ion herübergezogen wird und damit eine Umwandlung in eine inaktive Konformation bewirkt.
Aus den spektroskopischen Daten ging hervor, daß die aktuelle Struktur des aktiven Zentrums pH-abhängig ist. Dies hat zur Folge, daß der Ablauf der Mikroschritte während der Reaktion vom pH des Reaktionsmediums abhängt. Dies kommt bei den Hemmungen in einem pH-abhängigen Wechsel des Hemmtyps zum Ausdruck. Guanin und D-Ribose hemmen im pH-Bereich von 6,0 - 7,0 kompetitiv, während Guanosin im pH-Bereich von 5,5-4,5 kompetitiv hemmt. Umgekehrt gibt Guanin im pH-Bereich von 5,5-4,5 sigmoide v/s-Beziehungen, Guanosin hingegen im Bereich von pH 6,0 - 7,0. Vergleicht man nun die Lineweaver-Burk plots der jeweiligen Hemmung, dann erhält man im Bereich von pH 6,0 - 7,0 und pH 4,5 - 5,5 Schnittpunkte, d.h. bei einer bestimmten Substratkonzentration die gleiche Geschwindigkeit. Diese Schnittpunkte liegen wiederum auf einer Geraden (Abb. 43 und 44). Dabei zeigt sich, daß die Schnittpunkte für den Zusatz von Guanin, D-Ribose, Guanosin, Cytosin und 3'-Gp ihre Lage gegenseitig vertauschen. Die Lage der Schnittpunkte für den Zusatz von Phosphat und Pyrophosphat bleibt unverändert.

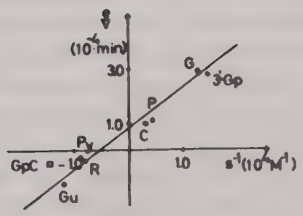


Abb.43: Schnittpunkte der Lineweaver-Burk plots im pH-Bereich 4,5 - 5,5 für die Hemmung der RNase T_1-Reaktion

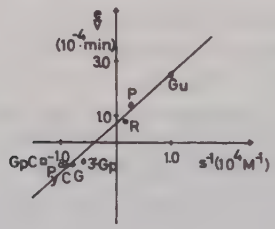
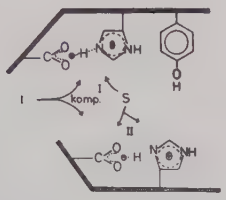


Abb.44: Schnittpunkte der Lineweaver-Burk plots im pH-Bereich 6,0 - 7,0 für die Hemmung der RNase T_1-Reaktion

Garaus kann geschlossen werden, daß die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat einmal in der Kopplung Carbamid-Struktur/2'-OH-Gruppe und Phosphat ablaufen (pH-Bereich 6,0-7,0) und zum andern in der Kopplung Carbamid-Struktur und 2'-OH-Gruppe/Phosphat (pH-Bereich 4,5 - 5,5). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Kernresonanz-Messungen ist bei pH 7,0 der Ablauf der Katalyse entsprechend Schema 7, während im Bereich von pH 4,5 - 5,5 die Verhältnisse entsprechend Schema 8 sein sollten.
Störung von Stufe I (Zusatz von Guanin) führt zu einem geänderetn Ablauf der Katalyse nach Schema 6. Störung von Stufe I und II (Zusatz von Guanosin und 3'-Gp) ergibt eine kompetitive Hemmung. Pyrophosphat ist in der Lage über den gan-

zen pH-Bereich, wenn die B-H···B-Systeme intakt sind, Stufe I und Stufe II zu stören, so daß eine kompetitive Hemmung resultiert.



Schema 8: schematische Darstellung der Vorgänge im aktiven Zentrum der RNase T_1 zur Erklärung der gefundenen Hemmungen im pH-Bereich von 4,5 - 5,5

Die auf Grund der spektroskopischen Daten aufgezeigte Konformationslabilität findet ihre Entsprechung durch die gefundenen Ergebnisse bei Zusatz von Ribose und Cytosin. Bei der Bindung des Substrates (in Stufe I ist immer die spezifische Bindung des Substrats enthalten) findet ein induced fit statt, der erst den Bindungswechsel ermöglicht. Diese Konformationsänderung sollte über die Wechselwirkung an der 2'-OH-Gruppe und die an der hydrophoben Bindungsseite zur 5'-Base (vgl. vermehrte Löschung der Fluoreszenz-Intensität der Tyrosine bei 2'-5'-GpC) ablaufen. Die bei Zusatz von Ribose und Cytosin gefundene Modifizierer- bzw. Substrat-Aktivierung zeigen diese Tatsache an, zumal hierbei keine Alternativ-Reaktion hervorgerufen wird. Denn die Bedingungen für Gl.35 sind hierbei nicht erfüllt, da die Gerade $1/\hat{v}$ gegen (I) eine Parallele zur (I)-Achse darstellt, d.h. durch Zusatz dieser Modifizierer werden Gleichgewichte des Enzyms zwischen aktiven und inaktiven Species verschoben.
Die Ergebnisse der Hemmungen, die zur Formulierung von Schema 7 und 8 führten, lassen es zu, Aussagen zu machen über den Mikroablauf der RNase T_1-Reaktion und über die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte.
Im pH-Bereich von 6,0 - 7,0 geht neben der Wechselwirkung

an der spezifischen Bindungsseite auch die an der 2'-OH-Gruppe ein. Daraus resultiert, daß, wie mehrfach gefunden wurde, bei der Umesterung K_m und k_{cat} miteinander gekoppelte Konstanten sind. Zum andern wird daraus verständlich, daß die zyklischen Diester wie G-2':3'-P einen zehnfach höheren K_m-Wert haben. Die eigentliche Umesterung wird durch ein System aus Carboxylat- und Imidazolium-Ion durchgeführt, daß über einen größeren pH-Bereich stabil ist, während die Hydrolyse durchgeführt wird mit Hilfe eines freien Imidazols, das das Wasser aktiviert. Daraus resultiert das steile Maximum bei pH 7,0 für k_{cat} des zweiten Schrittes. Im pH-Bereich von 4,5 - 5,5 besteht Stufe I nur aus der Wechselwirkung an der spezifischen Bindungsseite, so daß K_m und k_{cat} nicht mehr miteinander gekoppelt sind. Daraus ergibt sich, daß die K_m-Werte für GpC und G-2':3'-P in diesem pH-Bereich praktisch gleich sind. Ihre Vergleichbarkeit in diesem pH-Bereich mit den gefundenen K_i-Werten für Guanin, Guanosin und G-2':3'-P zeigt an, daß hier K_m nicht mehr ein komplexer kinetischer Parameter ist, sondern eine Michaelis-Menten-Konstante darstellt.

Diesen Verhältnissen entspricht die gefundene Umkehr der pK_m/pH- und $\log k_{cat}$/pH bzw. $\log v_{max}$/pH-Profile in beiden Schritten. Die aus den kinetischen Daten und aus den Daten der Kernresonanz-Spektroskopie ersichtliche völlige Reversibilität der Wechselwirkung an der spezifischen Bindungsseite findet ihren Ausdruck darin, daß diese Wechselwirkung über den ganzen pH-Bereich in Stufe I eingeht, d.h. der schnellste Schritt der Reaktion ist. Dies bedeutet, daß bei der Hydrolyse und der Umesterung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt jeweils die Durchführung des Bindungswechsels ist. Aus den thermodynamischen Daten folgt, daß der zugehörige aktivierte ES -Komplex nur wenig stabilisiert ist. Mit Erhöhung der Aktivierungsenergie und einer Abnahme der Entropie werden die K_m-Werte kleiner und die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt ab. Unter Zugrundelegung der van't Hoff'schen-Reaktionsisotherme bedeutet dies, daß ein Gleichgewicht zwischen einem aktivierten Komplex ES^* und ES besteht, bei dem der zugehörige Aktivierungsberg keine besondere Mulde aufweist.

F. Zusammenfassung

Eine umfassende kinetische Analyse der RNase T_1-Reaktion in Verbindung mit spektroskopischen Untersuchungen von Strukturelementen der RNase T_1 haben es möglich gemacht, einen detaillierten Mechanismus der RNase T_1-Reaktion aufzustellen. Die kinetischen Messungen umfassen Untersuchungen zur Abhängigkeit der kinetischen Parameter der Reaktion von Substrat, Wasserstoffionenkonzentration, Ionenstärke, Dielektrikum, Temperatur, Inhibitoren und Modifizierern. Die spektroskopischen Messungen schließen die Methoden der Kernresonanz-, Fluoreszenz- und Differenz-Spektroskopie ein. Es konnte gezeigt werden, daß die RNase T_1 eine pH-abhängige Struktur des aktiven Zentrums und dessen Umgebung hat. Das aktive Zentrum hat eine spezifische Bindungsseite, eine katalytische Seite und eine hydrophobe Wechselwirkungsseite zur 5'-Base der 3'-5'-Dinucleosid-Phosphate.
Die spezifische Bindungsseite wird aus einem Carboxylat-Ion einer Glutaminsäure, einem Imidazol und einem Tyrosin gebildet, die katalytische Seite aus einem Carboxylat-Ion einer Asparaginsäure und einem Imidazol. An der hydrophoben Wechselwirkung mit der 5'-Base ist Tyrosin beteiligt.
Das Substrat wird nach einem "induced fit"-Mechanismus gebunden und anschließend gespalten bzw. hydrolisiert, wobei zwischen der spezifischen Bindungsseite und der katalytischen Seite eine Kooperativität besteht, die in ihrer Richtung umkehrbar ist, d.h. unter bestimmten Bedingungen kann die Reaktion über einen Alternativ-Weg ablaufen. Von der durch das Substrat induzierten Konformationsänderung im aktiven Zentrum ist auch das Tryptophan 59 der RNase T_1 betroffen, ohne unmittelbar in die Reaktion einzugreifen.
Der Ablauf der Mikroschritte der Reaktion ist pH-abhängig. Im pH-Bereich 4,5 - 5,5 bildet Stufe I der Reaktion die Wechselwirkung an der spezifischen Bindungsseite und Stufe II den Bindungswechsel. Im 1.Schritt der Reaktion (der Umesterung) wird die 2'-OH-Gruppe des Dinucleosid-Phosphats deprotoniert und der 5'-Sauerstoff protoniert; im 2.Schritt der Reaktion (der Hydrolyse) wird der 2'-Sauerstoff protoniert, ohne daß die entscheidende Aktivierung des zur Durch-

führung der Reaktion notwendigen Wassermoleküls von Gewicht ist. Im pH-Bereich 6,0 - 7,0 umfaßt Stufe I im 1.Schritt der Reaktion die Wechselwirkung an der spezifischen Bindungsseite und an der 2'-OH-Gruppe, im zweiten Schritt nur die Wechselwirkung an der spezifischen Bindungsseite. In Stufe II geht bei der Umesterung die Protonierung des 5'-Sauerstoffs ein, bei der Hydrolyse die Wasseraktivierung. Die zusätzliche Bindung der 3'-5'-Dinucleosid-Phosphate über eine hydrophobe Wechselwirkung mit der 5'-Base findet in Stufe I statt. Der erste und der zweite Schritt der Reaktion laufen unabhängig voneinander ab. Unterhalb von pH 4,5 und oberhalb von pH 7,0 geht die RNase T_1 durch Konformationsänderungen, die durch eintretende Protonierungen und Deprotonierungen eingeleitet werden, in inaktive Isomere über. Es können deshalb so nur 2',3'- bzw. 3'-5'-Diester, die in der 1'-Stellung, ß-glykosidisch verknüpft, ein 6-Hydroxy-Purin haben, von der RNase T_1 gespalten werden.
Die Abbildungen 45 und 46 zeigen die Bildung des aktivierten ES^*-Komplexes und seinen Zerfall im 1.Schritt bei pH 5,0 bzw. pH 7,0.

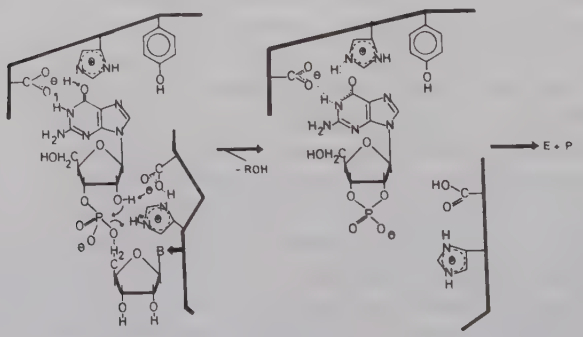


Abb.45: Bildung und Zerfall des aktivierten ES^*-Komplexes im 1.Schritt der RNase T_1-Reaktion bei pH 5,0

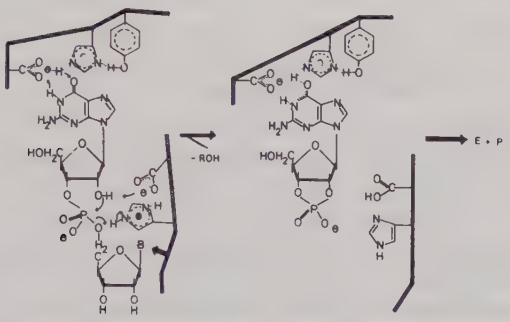


Abb.46: Bildung und Zerfall des aktivierten ES*-Komplexes im 1.Schritt der RNase T_1-Reaktion bei pH 7,0

Abbildung 47 zeigt die Vorgänge an der katalytischen Seite im 2.Schritt,wobei die Bindungsseite Abb.45 und 46 entspricht.

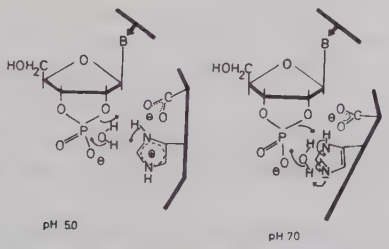


Abb.47: Aktivierung des Wassers und Bindungswechsel im 2. Schritt der RNase T_1-Reaktion bei pH 5,0 und 7,0

Die zwischen der katalytischen Seite und der spezifischen Bindungsseite der RNase T_1 bestehende Kooperativität hat einen neuen kinetischen Typ für den "one enzyme - one substrate"-Fall zur Folge. Durch einen Vergleich der experimentellen und der theoretischen Werte, die aus der für diesen Fall aufgestellten, analytisch exakten Gleichung berechnet wurden, konnte gezeigt werden, daß im "one enzyme - one substrate"-Fall immer dann, wenn die Möglichkeit einer Alternativ-Reaktion besteht, sigmoide v/s-Kurven auftreten können.

G. Experimenteller Teil

1. Darstellung der Substrate

a) Allgemeine Arbeitsmethoden

Papierchromatographie

In allen Fällen wurde absteigend chromatographiert an folgenden Papieren:

Hersteller	Nr.	Saughöhe	Kapazität
Schleicher u. Schüll	2071	12-15cm/24h	80mg/30cm
Schleicher u. Schüll	2043b	20-25cm/24h	15mg/30cm

Die Papiere 2071 und 2043b weisen etwa gleiche Trennschärfe auf, sie unterscheiden sich nur in der Kapazität.

Dünnschichtchromatographie

Hierfür wurde die Standardausrüstung nach E.Stahl verwendet.

Fließmittel

1.Isopropanol : H_2O : NH_3 konz. =7 : 2 : 1
2.Isopropanol : H_2O : NH_3 2M =7 : 2 : 1
3.Isopropanol : $NaCOOCH_3$ (1M) : $(NH_4)_2SO_4$ ges. =2 : 18 : 80

Die molaren tinktionen für die Konzentrationsbestimmungen wurden entnommen aus: UV-Atlas organ.Verb., G.H. Beaven et al. in "The Nucleic Acids",(81,82).

UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit einem Cary 15 in 1cm Quarzküvetten in H_2O gemessen, wenn nicht anders bei den jeweiligen Spektren angegeben.

b) Darstellung der Substrate

Hydrolyse von RNA mit $Bi(OH)_3$ (83)

200g $BiCl_3$ werden in 70ml HCl konz. gelöst und unter

heftigem Rühren langsam in 3 Liter 1,5N NaOH unter Zugabe von Eis gegossen. Das fein abgeschiedene $Bi(OH)_3$ wird durch Dekantieren gewaschen, bis das Waschwasser neutral ist. Die $Bi(OH)_3$-Suspension wird in einem 4-Liter-Dreihalskolben (mit Kühler und Rührer) zum Sieden erhitzt. 100g Heferibonucleinsäure (Fa.Zellstoff Waldhof) in kleinen Portionen eingetragen und 2 Stunden unter heftigem Rühren gekocht. Anschließend heiß absaugen und den Filterkuchen mit 1,5l H_2O auskochen und absaugen. Das gelbliche Filtrat wird nach Abkühlung mit NH_3 auf pH 5,0-5,3 gebracht und auf eine Säule (90cm Länge, 6cm Durchmesser) mit Dowex 1x2 (50-100 mesh), Formiatform, gegeben. Die Säule wird H_2O gewaschen, bis alle Nucleoside entfernt sind. Dann wird der Austausch mit einem Ameisensäure-Gradienten vorgenommen. Die Eluate (200ml Portionen) werden gefriergetrocknet, nachdem ihre Konzentration und die ungefähre Zusammensetzung der enthaltenen Substanzen anhand des Quotienten E_{280}/E_{260} bestimmt worden sind. Die Laufzeit der Säule beträgt etwa 3 Monate. Die Rohprodukte wurden durch nochmalige Säulenchromatographie an kleineren Säulen, Papierchromatographie und/oder -elektrophorese gereinigt. Ihre Einheitlichkeit wurde durch Spektren, totale Spaltung durch entsprechende RNasen und Papierchromatographie sichergestellt.
Auf diese Weise wurden folgende Substanzen gewonnen:
GpC, GpA, GpU, GpG, ApC, CpC und ApA.

Darstellung von IpC (83)

70 mg ApC wurden in einem Ameisensäurepuffer von pH 3,4 gelöst und mit 10ml einer 1n $NaNO_2$-Lösung versetzt. Nachdem das Reaktionsgemisch 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen worden war, wurde die Lösung vorsichtig im Vakuum zu einem Öl eingeengt und anschließend das erhaltene Öl papierchromatographisch aufgetrennt in Fließmittel2. Die Reinheitsprüfung erfolgte wie oben.

Darstellung von XpC (84)

25mg GpC wurden zu 5ml einer essigsauren Lösung von pH 2,8 hinzugegeben, die 4mg $NaNO_2$ enthielt, und bei Raumtemperatur 24 Stunden stehen gelassen. Nach Neutralisation mit ver-

dünntem Ammoniak wurde das Reaktionsgemisch auf eine Ionenaustauschersäule (Dowex 1x2, Formiatform, 15cm lang und 0,5cm Durchmesser) aufgetragen und mit einem Ameisensäure-Gradienten eluiert. Von den Fraktionen wurde der Quotient E_{280}/E_{260} bestimmt. Die Fraktionen mit einem Quotienten 0,93, entsprechend X + C bei pH 2,8, wurden gesammelt und gefriergetrocknet. Die Reinheitsprüfung erfolgte wie oben.

Darstellung von 3'-Guanylsäurebenzylester

50mg $N^2,O^{2'},O^{5'}$-Trimethyl-3'-guanylsäure (1mMol) wurden in möglichst wenig wasserfreiem Pyridin unter Zusatz von DMFA gelöst. Nach dem Zusatz von 0,5mMol Benzylalkohol und 1mMol Dicyclohexylcarbodiimid wurde das Reaktionsgemisch verschlossen 8 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Dann wurde bis zur Trübung Wasser zugesetzt, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff extrahiert und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde über Nacht mit 20 ml Ammoniak in Methanol (bei 0°C gesättigt) behandelt, erneut zur Trockene eingedampft und dann in Wasser aufgenommen. Nach Filtration von Ungelöstem wurde das Produkt eingeengt und durch Papierchromatographie - Fließmittel 2 - isoliert. R_F: 0,44. Spektrum: λ_{max} 255nm, λ_{min} 227nm -pH 1-, λ_{max} 251nm, λ_{min} 223nm - pH 7,0 -.

Darstellung von C-2':3'-P, U-2':3'-P, A-2':3'-P, G-2':3'-P (85)

10mMol des Nucleotids werden in 25ml 2N NH_3 und 50ml DMFA gelöst. Dazu wird eine Lösung von 50mMol Dicyclohexylcarbodiimid in 25ml t-Butanol gegeben. Das Gemisch wird 2 Stunden am Rückfluß gekocht. Nach Abdampfen des t-Butanols i.V. wird mit 200ml H_2O verdünnt, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und das Filtrat dreimal mit je 150ml Äther ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wird i.V. zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in wenig trockenem CH_3OH gelöst. Mit der gerade ausreichenden Menge $BaBr_2$ in CH_3OH wird das Bariumsalz des zyklischen Nucleotids gefällt. Nach dem Absaugen wird der Rückstand 4mal mit CH_3OH, 2mal mit CH_3OH/Äther (1:1) und mit 2mal mit Äther gewaschen. Zur Reinheitsprüfung eignet sich die Papierchromatographie in Fließmittel 3.

Darstellung von 8-OH-G-2':3'-P (86)

1mMol 8-OH-G (87) in 2ml DMFA und 1ml Triäthylphosphit werden nach Zugabe von 0,2ml 3,3N HCl in DMFA über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zusatz von 0,2ml Triäthylamin engt man das Reaktionsgemisch ein bei 30°C/0,5 Torr, nimmt den Rückstand mit 100ml 3N NH_3 auf und engt die Lösung bei Raumtemperatur wieder ein. Das Gemisch wird in 3ml DMFA aufgenommen und bei Eiskühlung unter Rühren mit 1,5ml Hexachloroaceton versetzt und dann bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Den ausgefallenen Niederschlag zentrifugiert man ab, wäscht mit 5ml DMFA und engt die vereinigten DMFA-Lösungen bei 40°C/ 0,5 Torr ein. Mit Wasser wird verdünnt und anschließend zweimal mit 10ml Äther ausgeäthert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden wieder eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Wasser gelöst und papierchromatographisch aufgetrennt. R_F: 0,11 in Fließmittel 2. Die Reinheitsprüfung erfolgte wie oben.

Darstellung von N-1- und N-7-me-GpC (88)

20mg GpC werden in 3ml H_2O gelöst, mit NaOH neutralisiert und mit 0,8ml Tri-N-butylamin und 0,25ml Dimethylsulfat versetzt. Das Gemisch wird in einem verschlossenen Erlenmeyerkolben über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Nach dieser Zeit wird noch einmal 0,4ml Tri-N-butylamin und 0,1ml Dimethylsulfat hinzugegeben und das Reaktionsgemisch weitere 24 Stunden stehen gelassen. Es wird dreimal mit je 10ml Äther ausgeäthert. Die vereinigten wässrigen Phasen engt man ein und trennt das Gemisch in Fließmittel 2 papierchromatographisch. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte durch Hydrolyse zu den Basen in 1N HCl, deren spektrale Daten bekannt sind (89). N-1-me-GpC: R_F: 0,20, λ_{max} 268nm, λ_{min} 246nm -pH 7,0-,
N-7-me-GpC: R_F: 0,10, λ_{max} 272nm, λ_{min} 242nm -pH 7,0-.

Darstellung von N-1- und N-7-me-G-2':3'-P

100mg G-2':3'-P wurden in 10ml H_2O gelöst, auf pH 7,0 eingestellt und durch Zusatz von einer Spatelspitze Dimethylglutarsäure leicht abgepuffert. Unter Eiskühlung wurde mit 30ml einer ätherischen Diazomethan-Lösung versetzt und noch eine halbe Stunde bei 0°C gerührt. Vom Niederschlag wurde abfiltriert, die ätherische Phase verworfen und die wässrige ein-

geengt. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte papierchromatographisch in Fließmittel 2 und 3. Die Hydrolyse zu den entsprechenden Basen diente als Nachweis.
N-1-me-G-2':3'-P:R_F:0,25 in Fl.2, λ_{max} 253nm, λ_{min} 231nm -pH 7,0-
N-7-me-G-2':3'-P:R_F:0,18 in Fl.2, λ_{max} 248nm, λ_{min} 234nm -pH 7,0-

Darstellung von N-7-me-Guanosin (90)

Zu einer Lösung von 2'3'5'-Tri-O-acetylguanosin (0,7g) in 20ml Methanol und 3ml Aceton wurden unter Eiskühlung 33ml ätherische Diazomethan-Lösung hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 0°C stehen gelassen. Das ausgefallene N-7-Methylguanosin wurde gesammelt und mit trockenem Äther gewaschen. Umkristallisiert wurde in wässrig-methanolischer Lösung. m.p. 159-160°C, Ausbeute: 53% d.Th.

Darstellung von 2'-Cp, 3'-Cp, 2'-Ap, 3'-Ap, 2'-Up, 3'-Up (91)

Die gemischten 2',3'-Isomere von Up (Fa. Boehringer, Mannheim), Cp und Ap (Fa. Zellstoff, Waldhof) wurden quantitativ durch Säulenchromatographie getrennt, indem Dowex 1-X10 mit einem Ameisensäure-Gradienten verwendet wurde.

Darstellung von 3'-Gp

3'-Gp wurde durch enzymatische Hydrolyse von G-2':3'-P mit RNase T_1 dargestellt. Die Isolierung erfolgte papierchromatographisch in Fließmittel 1.

Darstellung von 3'-Cp-methyl

100mg 3'-Cp werden in H_2O gelöst und mit 1N NaOH auf pH 4,95 titriert. Die Lösung wird zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in möglichst wenig Dimethylsulfat gelöst und mit ätherischer Diazomethan-Lösung versetzt, bis eine schwache Gelbfärbung bestehen bleibt. Nach Entfernen des Äthers wird mit H_2O auf ca.250ml verdünnt. Das Reaktionsgemisch wird durch Säulenchromatographie an Dowex 1x2 (Formiat-Form) mit einem Ameisensäure-Gradienten gereinigt. R_F: 0,38 in Fl.1.

2. Darstellung der RNase T_1

Die Gewinnung des Enzyms aus einem Aspergillus oryzae-Extrakt wurde in der Diplomarbeit beschrieben. Für die spektroskopischen Messungen wurde eine Präparation von Sankyo,Tokyo,benutzt.

3. Kinetische Messungen

Spektralphotometrische Methode

Sie beruht auf einer hypochromen Verschiebung zwischen den Spektren der Dinucleosid-Phosphate und der zyklischen Diester. Die Kinetik der Dinucleosid-Phosphate wurde mit einem Cary 15 gemessen. Der Puffer wurde in Vergleichs- und Probenküvette gegeben, und das Substrat entweder mit einer feinen Glaskapillare zugesetzt, wobei die Konzentration anhand des registrierten Eichspektrums aus der Exstinktion bei einer bestimmten Wellenlänge ermittelt wurde, oder es wurde mit einer Mikrometerspritze zugegeben, wobei die Konzentration aus der Exstinktion der verwendeten Substratlösung und ihrer Menge berechnet wurde. Eine gute Durchmischung wurde mittels Durchblasen von Luft erzielt.
Aus einer mm^3-Pipette wurde die Enzymlösung (RNase T_1 in 0,2m NaCl gelöst) bei laufender Registrierung (konstante Wellenlänge) eingeführt. Die Durchmischung wurde wieder durch Einblasen von Luft herbeigeführt. Da die Reaktion startet, sobald die Enzymlösung in die Reaktionslösung eingeführt ist, muß sehr rasch gearbeitet werden. Die ersten 30 sec. lassen sich deshalb auch nicht auswerten.
Registriert wird die zeitliche Veränderung der Exstinktion. Der Endpunkt, der für die Auswertung unbedingt notwendig ist, ist erreicht, wenn sich die Exstinktion nicht mehr ändert. Alle kinetischen Messungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in 0,05m Dimethylglutarsäure-Puffer der Ionenstärke 0,2 durchgeführt.

pH-stat-Methode

Sie beruht darauf, daß bei der Hydrolyse der 2',3'-zyklischen Diester zu 3'-Monoestern ein Proton pro Molekül gebildetes Produkt freigesetzt wird, wenn man bei einem pH-Wert arbeitet, der hinreichend oberhalb des pK_2-Wertes der Phosphorsäuremonoester liegt.
Die Kinetik der zyklischen 2',3'-Diester wurde nach dieser Methode mit einem Radiometer TTT-1-pH-stat, an den ein PHA 630 Ta Scale Expander angeschlossen war, aufgenommen. Die

Meßkette bestand aus einer G 2222c Glas-Elektrode und einer KH 2 Kalomel-Elektrode.
Zu 2ml einer 0,2M NaCl-Lösung wurde mit einer Mikrometerspritze eine Lösung des entsprechenden Substrats in 0,2M NaCl bestimmter Konzentration zugesetzt und die Lösung auf den entsprechenden pH, bei dem die Kinetik gemessen werden sollte, mit 0,2N NaOH titriert.
Aus einer mm^3-Pipette wurde die RNase T_1 (in 0,2M NaCl gelöst und ebenfalls auf den pH der Messung titriert) bei laufender Registrierung eingeführt. Eine gute Durchmischung wurde durch einen Magnetrührer gewährleistet.
Registriert wird der Verbrauch an NaOH in Abhängigkeit von der Zeit.

Auswertung

Hierzu wird die Differenz zwischen den momentanen Exstinktionen und dem Endwert in Abständen von 30 sec. aus der Reaktionskurve entnommen und der Logarithmus dieser Differenz aufgetragen. Die so erhaltenen Meßpunkte liefern während der ersten 3-4 Minuten eine Gerade, deren Steigung (tgα) dem Diagramm entnommen wird. Spätere Abweichungen der Meßpunkte von dieser Geraden werden nicht mehr berücksichtigt. Daraus wird dann die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion berechnet nach $v = 2{,}303 \cdot s \cdot tg\alpha$- (Mol/Liter min). Bei der pH-stat-Methode wird analog dazu der Logarithmus des NaOH-Verbrauchs gegen die Zeit aufgetragen und daraus der tg entnommen. Aus diesen v-Werten ergeben sich dann die Lineweaver-Burk plots, indem e/v gegen 1/s aufgetragen wird.

Messung der Spaltungsgeschwindigkeit von 3'-Guanylsäurebenzylester

Die Reaktion wurde in 0,15ml Dimethylglutarsäure-Puffer bei 25°C durchgeführt, wobei gleichzeitig ein Test ohne Enzymzugabe parallel lief. Durch Zugabe von 2N NH_3 aus einer feinen Kapillare wurden 0,01ml-Proben der Reaktion in bestimmten Zeitabständen abgestoppt und die Produkte papiechromatographisch in Fließmittel 3 aufgetrennt. Die Menge der Produkte wurde durch Elution und Messung der Exstinktion mittels eines Spektralphotometers bestimmt. Die verwendete Enzymkonzentration in der Lösung war $4{,}44 \cdot 10^{-7}$mol/l, die Konzentration des

Substrats $5{,}93 \cdot 10^{-4}$ mol/l.
Es wurde ein v_o erhalten von $8{,}0 \cdot 10^{-5}$ min^{-1}.

4. Spektroskopische Messungen

Kernresonanz-Spektroskopie

Die RNase T_1 wurde von Sankyo Co.,Ltd., Tokyo, erhalten (Lot No. 8R020).
Alle Proben wurden in 0,2M Acetat-Puffer gelöst, pH 5,25, der aus CD_3COOD, NaOD, und 99,85% D_2O hergestellt wurde. Die Spektren wurden aufgenommen mit einem Varian Associates HA 100 NMR-Spektrometer, ausgestattet mit einem internen lock-System und autoshim device. Ein Varian C1024 CAT wurde verwendet, um die Spektren zu speichern. Die gezeigten Spektren sind das urchschnittliche Mittel von 50-70 Aufnahmen. Die Probentemperatur betrug 28°C. Die Präzisions-NMR-Röhrchen wurden von Wilmad Glass Co. erhalten. TMS war der externe Standard. Der pH-Wert aller Lösungen wurde eingestellt mit 0,1M DCl oder NaOD unter Verwendung eines Radiometer TTT-1 Titrator und einer Mikro-Einstabelektrode (Ingold 405-M-3/2-a). Alle angegebenen pH-Werte entsprechen der aktuellen Skalen-Ablesung und sind unkorrigiert. Die Versuche wurden mit Herrn Dr. Rüterjans, Inst.f.Physik.Chemie Münster, durchgeführt.

Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Spektren der RNase T_1 wurden mit einem Amin-co-Bowman gemessen. Die Fluoreszenz-Intensitäten von Tyrosin und Tryptophan wurden bei 295nm bzw. 360nm gemessen. Die Anregung war immer bei 280nm. Bei allen Messungen, wenn nicht anders angegeben, wurde die RNase T_1 (0,1mg/ml) in 0,1M KCl gelöst. Die Messungen wurden in 1ml Quarzküvetten (speziell für Fluoreszenz-Messungen) durchgeführt. Die Temperatur wurde dabei bei 25°C gehalten. Die pH-Werte wurden mit 0,01N NaOH oder HCl eingestellt unter Verwendung eines Radiometer pH-Meters (Modell 25) und einer Mikro-Einstab-Elektrode (s.o.)

Differenz-Spektroskopie

Zur Messung der Differenz-Spektren wurden Tandem-Zellen verwendet, die in Proben- und Vergleichs-Kanal gestellt wurden.

Alle Messungen wurden in Dimethylglutarsäure-Puffer und bei 25°C durchgeführt. Die Dioden-Einstellung des verwendeten Cary 15 betrug 3. Für jedes Differenz-Spektrum wurde die Null-Linie jeweils neu mit Hilfe der Multipots eingestellt. Die Konzentration der RNase T_1 und der 3'-Gp-Lösung betrug jeweils 10^{-6} mol/l.

H. Literaturverzeichnis

(1) Kuninaka,A., J.Agr.Chem.Soc.Japan 29 (1955) 797
(2) Saruno,R., Bull.Agr.Chem.Soc.Japan 20 (1956) 57
(3) Sato,K.,Egami,F., J.Biochem.(Tokyo) 44 (1957) 753
(4) Egami,F.,Takahashi,K.,Uchida,T., "Procedures in Nucleic Acid Research",Vol.3, New York 1964, S.51
(5) Egami,F., J.Sci.Ind.Res. 25 (1966) 442
(6) Whitfeld,P.,Witzel,H., Biochim.Biophys.Acta 72 (1963)338
(7) Sato,K.,Egami,F., Biochem.Zeitschr. 342 (1965) 437
(8) Heppel.L.A.,Whitfeld,P.R.,Markham,R., Biochem.J. 60 (1955) 8
(9) Barker,G.R.,Montague,M.D.,Moss,R.J.,Parsons,M.A., J.Chem.Soc. (1957) 3786
(10) Grünberger,D.,Holy,A.,Sorm,F., Coll.Czech.Chem.Commun. 33 (1968) 286
(11) Yamagata,S.,Takahashi,K.,Egami,F.,J.Biochem.(Tokyo) 52 (1962) 261
(12) Weil,L.,Seibles,T.S., Arch.Biochem.Biophys.54 (1955) 368
(13) Saigusa,S.,Takahashi,K.,Egami,F., J.Biochem.(Tokyo) 51 (1961) 48
(14) Takahashi,K.,Stein,W.H.,Moore,S.,J.Biol.Chem. 242 (1967) 4682
(15) Tarao,T.,Ukita,T., Biochim.Biophys.Acta 149 (1967) 613
(16) Gundlach,H.G.,Stein,W.H.,Moore,S., J.Biol.Chem. 234 (1959) 1754
(17) Lamden,M.P.,Mathias,A.P.,Rabin,B.R.,Biochem.Biophys.Res. commun. 8 (1962) 209
(18) Irie,M., J.Biochem.(Tokyo) 56 (1964) 495
(19) Mathias,A.P.,Rabin,B.R.,Ross,C.A., Biochem.Biophys.Res. Commun. 3 (1960) 625
(20) Hummel,J.P.,Verploes,D.A.,Nelson,C.A., J.Biol.Chem. 236 (1961) 3168
(21) Anderson,D.G.,Hammes,G.G.,Walz,F.G.,Biochemistry 7 (1968) 1637
(22) Stein,W.D.,Barnard,E.A.,J.Mol.Biol. 1 (1959) 350
(23) Beers,R.F.,J.Biol.Chem. 235 (1960) 2393
(24) Irie,M., J.Biochem.(Tokyo) 58 (1965) 599
(25) Gassen,H.,Witzel,H.,Europ.J.Biochem.1 (1967) 36

(26) Follmann,H.,Wieker,H.,Witzel,H.,Europ.J.Biochem. 1 (1967) 243
(27) Irie,M., J.Biochem.(Tokyo) 61 (1967) 550
(28) Dixon,M.,Webb,E.C.,"The Enzymes", London 1960, S.62 ff
(29) Ts'o,P.O.P.,Rappoport,S.A.,Bollum,F.J., Biochemistry 5 (1966) 4151
(30) Schweizer,M.P.,Broom,A.D.,Ts'o,P.O.P.,Hollis,D.P., J.A.C.S. 90 (1968) 1042
(31) Fox,J.J.,Cavalieri,L.F.,Chang,N.,J.A.C.S. 75 (1953) 4315
(32) Baker,B.R., J.Med.Chem. 10 (1967) 59
(33) McCully,K.S.,Cantoni,G.L.,Biochim.Biophys.Acta 51 (1961) 190
(34) Staehelin,M., Biochim.Biophys.Acta 31 (1959) 448
(35) Michelson,A.M.,Pochon,F., Biochim.Biophys.Acta 114 (1966) 469
(36) Reiner,J.,Zamenhof,S.,J.Biol.Chem. 228 (1957) 475
(37) Ulbricht,T.L.V., Tetrahedron Letters 14 (1966) 1561
(38) Egami,F., Sato-Asano,K., Nature 185 (1960) 462
(39) Lineweaver,H.,Burk,D., J.A.C.S. 56 (1934) 658
(40) Tinoco,J.,Warshaw,M., J.Mol.Biol. 20 (1966) 29
(41) Follmann,H., Tetrahedron Letters 22 (1967) 2113
(42) Hamm,P., Diplomarbeit Marburg 1966
(43) Bonnacker,L., Dissertation Marburg 1968
(44) Hummel,J.P.,Witzel,H., J.Biol.Chem. 241 (1966) 1023
(45) Laidler,K.J.,Eyring,H.,Ann.N.Y.Acad.Sci. 39 (1940) 303
(46) Scatchard,G., J.Chem.Phys. 7 (1939) 657
(47) Laidler,K.J.,"The Chemical Kinetics of Enzyme Action" Oxford 1958, S.205
(48) Eyring,H., J.Chem.Phys. 3 (1935) 107
(49) Waley,S.G., "Mechanisms of Organic and Enzymic Reactions" Oxford 1962, S.65
(50) Takahashi,K., J.Biol.Chem. 240 (1965) 4117
(51) Meadows,D.H.,Markley,J.L.,Cohen,J.S.,Jardetzky,O., P.N.A.S. 58 (1967) 1307
(52) Nakamura,A.,Jardetzky,O., P.N.A.S. 58 (1967) 2212
(53) Cohen,J.S.,Jardetzky,O., P.N.A.S. 60 (1968) 92
(54) Wyckoff,H.W.,Hardman,K.D.,Allewell,N.M.,Inagami,T., Tsernoglou,D.,Johnson,L.N.,Richards,F.M., J.Biol.Chem. 242 (1967) 3749

(55) Meadows,H.D.,Jardetzky,O.,Epand,R.M.,Rüterjans,H.H., Scheraga,H.A., P.N.A.S. 60 (1968) 766
(56) Meadows,H.D.,Jardetzky,O., P.N.A.S. 61 (1968) im Druck
(57) Rüterjans,H.H.,Witzel,H., in Vorbereitung
(58) Bruzzesei,M.R.,Chiancone,E.,Antonini,E., Biochemistry 4 (1965) 1796
(59) Edelhoch,H.,Steiner,R.F., "Electronic Aspects of Biochemistry", New York 1964, S.7
(60) Weber,G.,Teale,F.W., "The Proteins", Vol.3, New York (1965), S.445
(61) Cowgill,R.W., Biochim.Biophys.Acta 112 (1966) 550
(62) Steiner,R.F.,Edelhoch,H.,Lippoldt,R.E.,Frattali,V., Biopolymers Symp. 1 (1964) 355
(63) Webr,G.,Rosenheck,K., Biopolymers Symp. 1 (1964) 333
(64) Howerton,H.K., ISA J. 6 (1959) 50
(65) Lippert,E.,Lueder,W.,Moll,F.,Naegele,W.,Bors,H.,Prigge, H.,Scibold-Blankenstein,I., Angew.Chem. 73 (1961) 695
(66) Teale,F.W.J., Biochem.J. 76 (1960) 381
(67) Cuatrecasas,P.,Edelhoch,H.,Anfinsen,B.C., P.N.A.S. 58 (1967) 2043
(68) Chen,R.F., Analytical Letters 1 (1967) 35
(69) McRae,E.G., J.Phys.Chem. 61 (1957) 562
(70) Herskovits,T.T.,Laskowski,M., J.Biol.Chem. 237 (1962) 2481
(71) Herskovits,T.T.,Sorensen,M., Biochemistry 7 (1968) 2523
(72) Herskovits,T.T., in "Methods in Enzymology" VolXI (1967) New York, S.748
(73) Donovan,J.W., Biochemistry 4 (1965) 823
(74) Glaser,A.N.,Smith,E.L., J.Biol.Chem. 236 (1961) 2942
(75) Herskovits,T.T.,Laskowski,M., J.Biol.Chem. 243 (1968) 2123
(76) Webb,J.L.,"Enzyme and Metabolic Inhibitors",New York 1963
(77) Cleland,W.W., J.Biol.Chem. 240 (1965) 3399
(78) Sweeny,I.R.,Fisher,J.R., Biochemistry 7 (1968) 561
(79) Hearon,J.Z.,Bernhard,S.A.,Friess,S.L.,Botts,D.J.,Morales, M.F., Enzymes 1 (1959) 49
(80) Eigen,M.,Hammes,G.G., in "Advances in Enzymology"Vol.25 (1963), S.1

(81) UV-Atlas organ.Verb., Vol.1 (1966), Weinheim
(82) Beaven,G.H.,Holiday,E.R.,Johnson,E.A., in "The Nucleic Acids", Vol.1, New York (1955), S.493
(83) Dimroth,K.,Witzel,H., Ann.Chem.620 (1959) 109
(84) Witzel,H., Ann.Chem.635,(1960) 182
(85) Smith,M.,Moffatt,J.G.,Khorana,H.G., J.A.C.S. 80 (1958) 6204
(86) Holy,A.,Scheit,K.H., Chem.Ber. 99 (1966) 3778
(87) Holmes,R.E.,Robins,R.K., J.A.C.S. 86 (1964) 242
(88) Michelson,A.M.,Pochon,F., Biochim.Biophys.Acta 114 (1966) 469
(89) Reiner,J.,Zamenhof,S., J.Biol.Chem. 228 (1957) 485
(90) Haines,J.A.,Reese,C.B.,Lord Todd, J.Chem.Soc. (1962)5281
(91) Cohn,W.E.,Khym,J.X., Biochem.Prep.5 (1957) 40

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Dr. H. Witzel,

danke ich für die Anleitung und sehr wohlwollende
Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 3.Januar 1945 wurde ich als zweiter Sohn des Textilkaufmanns Harald Pongs und seiner Ehefrau Ingeborg, geborene Meder, in Hameln/Weser geboren.

Von 1951 bis 1954 besuchte ich die evangelische Volksschule Wickrath/Niers. 1963 bestand ich am Städtischen Gymnasium Rheydt-Odenkirchen die Reifeprüfung.

Seit dem Sommersemester 1963 studiere ich an der Philipps-Universität Marburg Chemie. Hier bestand ich 1964 die Vordiplomprüfung und 1966 die Hauptdiplomprüfung.

Unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Witzel beschäftigte ich mich während meiner Diplom- und Doktorarbeit mit biochemischen Problemen, vor allem auf dem Gebiet der physikalischen Biochemie.

Meine akademischen Lehrer waren:

Bär, Balli, Dimroth, Drawert, Hänisch, Hellner, Hengge, Hensel, Karlson, Kirmse, Kuhn, Mahr, Mattes, Musso, Nöth, Petry, Pfeil, Schäfer, Schmid, Schmidbaur, Schmidt, Seidel, Stange, Walcher, Wieland, Witzel, Zilliken.